

# **SNP-MARKKERIT TYÖKALUNA R9-KROMOSOMIALUEIDEN TUNNISTUKSESSA RYP SIN RISTEYTY SJÄLKELÄISTÖSSÄ**

Säde Virkki  
Maisterintutkielma  
Helsingin yliopisto  
Maataloustieteiden osasto  
Kasvinjalostus  
2020

|   |  |   |                                |
|---|--|---|--------------------------------|
| Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion<br>Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta  |  | Laitos — Institution<br>Maataloustieteiden osasto |                                |
| Tekijä — Författare<br>Säde Virkki  |  |   |                                |
| Työn nimi — Arbetets titel<br>SNP-markkerit työkaluna R9-kromosomialueiden tunnistuksessa rypsin risteytysjälkeläistössä  |  |   |                                |
| Oppiaine — Läroämne<br>Kasvintuotantotieteet, Kasvinjalostus  |  |   |                                |
| Työn laji — Arbetets art<br>Maisterintutkielma  |  | Aika — Datum<br>Maaliskuu 2020                    | Sivumäärä — Sidoantal<br>73 s. |
| Tiivistelmä — Referat<br><p>Sadontuottokyvyn nostaminen on yksi rypsin (<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>oleifera</i>) kasvinjalostuksen tavoitteista, mikä voitaisiin toteuttaa hybridijalostusmenetelmällä. Rypsillemme hybridisiemenjalostamiseen lupaavin menetelmä on japanilaiselta retikalta (<i>Raphanus sativus</i>) rapsille (<i>Brassica napus</i> subsp. <i>oleifera</i>) siirretty Ogu-INRA cms/Rf-hybridisementuotantomenetelmä. Rypsillemme kehitetystä menetelmästä puuttuu vielä siitepölytuotannon palauttavaa isälinja, jonka tuottamiseksi ratkaisua on lähdetty hakemaan rypsin ja rapsin lajien välisten risteytysten kautta. Rypsi, rapsi ja retikka sisältävät samankaltaisia alueita perimäaineksessaan, mikä mahdollistaa retikan siitepölytuotannon palauttava PPR-geenialueen siirtymisen rapsilta rypsillemme.</p> <p>Työssä tavoitteena oli kehittää R9-kromosomialueiden tunnistamiseen SNP-työkalu. Tavoitteena oli SNP-työkalulla tunnistaa rypsin risteytysjälkeläistön F1 hybridi yksilöt, joilla fertiliteetin palauttava PPR-B-geenialue on integroitunut ylimääräisestä retikan kromosomista rypsin genomiin. Aiemmin hankkeessa PPR-geeni oli paikannettu retikan R9-kromosomiin retikan BAC64-kloonin avulla, minkä johdosta työssä keskityttiin R9 kromosomialueiden tunnistamiseen. SNP-työkalun kehittämistä varten tavoitteena oli hakea tietokanta, jota käytettäisiin lajispesifisten retikan SNP-merkkien valintaan. Työhön valittiin <i>B.rapa</i> -tietokantoja, joilla valittujen SNP-merkkien lajispesifisyys testattiin laboratoriossa.</p> <p>Työssä kehitetty SNP-työkalu koostui lajispesifisistä 28 retikan SNP-merkistä ja 48 rypsin SNP-merkistä. Tuloksissa havaittiin rypsin risteytysjälkeläistön fertiileillä yksilöillä neljän retikan SNP -merkin monistuminen, mitkä sijaitsevat R9-kromosomissa lähimpänä fertiliteetin palauttavaa PPR-B-geenialuetta. Kuitenkaan SNP-työkalulla ei pystynyt osoittamaan onko integraatio tapahtunut tutkitun aineiston fertiileillä yksilöillä vai onko fertiliteetin palauttava PPR-B-geenialue vielä integroitumattomana retikan kromosomina, koska kaikki SNP-työkalun rypsin SNP-merkit monistuivat rypsin risteytysjälkeläisillä.</p> <p>Työssä kehitettyä SNP-työkalua ei voi hyödyntää rypsin hybridijalostusmenetelmän kehittämisessä, koska integroitumisen seulonta haluttaisiin tehdä jo rypsin risteytysjälkeläistön F1 hybrideissä. Työssä havaittuja rypsin risteytysjälkeläistön fertiileissä monistuneita retikan SNP-merkkejä voisi käyttää DNA-valintamerkkeinä tunnistettaessa yksilöitä, joilla on fertiliteetin F1 hybrideissä palauttava PPR-B-geenialue rypsin genomissa. Lisäksi tässä tutkimuksessa SNP-työkalun avulla selvisi, että genomissa ylimääräisenä oleva retikan kromosomi ei ole kokonaisena. Tämä tutkimus liittyy Rypsin hybridimenetelmän kehittäminen-tutkimusprojektiin, jossa tutkitaan lähisukuisten kasvilajien välisten risteytysten hyödyntämistä rypsin jalostuksessa yhteistyössä Boreal Kasvinjalostus Oy:n kanssa.</p> |  |   |                                |
| Avainsanat — Nyckelord<br>rypsi, retikka, sukulaissuhteet, hybridijalostusmenetelmä, SNP-merkki, PPR-geenialue  |  |   |                                |
| Säilytyspaikka — Förvaringsställe<br>Maataloustieteiden osasto ja Viikin kampuskirjasto   |  |   |                                |
| Muita tietoja — Övriga uppgifter<br>Työtä ohjasivat Tarja Niemelä ja Outi Manninen  |  |   |                                |

## UNIVERSITY OF HELSINKI

|  |                              |   |
|--|------------------------------|---|
| Faculty<br>Faculty of Agriculture and Forestry   |                              | Department<br>Department of Agricultural Sciences |
| Author<br>Säde Virkki  |                              |   |
| Title<br>Using SNP-markers in identifying R9 chromosome parts in interspecific crossing program of turnip rape   |                              |   |
| Subject<br>Plant Production Science, Plant breeding  |                              |   |
| Level<br>Master's thesis   | Month and year<br>March 2020 | Number of pages<br>73 p.                          |
| <p>Abstract</p> <p>Increasing crop yield is one of the objectives of plant breeding to turnip rape (<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>oleifera</i>), which could be achieved with hybrid breeding method. Most promising method for turnip rape is the Ogu-INRA cms / Rf hybrid seed production method, which transferred from Japanese radish (<i>Raphanus sativus</i>) to rapeseed (<i>Brassica napus</i> subsp. <i>oleifera</i>). The hybrid breeding method for turnip rape still lacks a fertility restorer paternal line and solution has been sought through interspecific crosses between turnip rape and rapeseed. Turnip rape, rapeseed and radish contain similar regions in their genetic material, which allows the transfer of radish's fertility restoring PPR-gene region from rapeseed to turnip rape.</p> <p>The aim of this Master's thesis was to develop an SNP-tool for the identification of R9 chromosome regions and using SNP-tool to identify turnip rape F1 hybrid offsprings, which have fertility restoring PPR-B gene region, integrated from radish extra chromosome into the turnip rape genome. Earlier in the project PPR-gene was located to the R9 chromosome with BAC64-clone, therefore work focused solely on identifying R9 chromosome regions. For the development of the SNP-tool, objective was to search for a database and select species-specific SNP-markers with in silico-method. <i>B. rapa</i> databases were selected for the work and SNP-markers species specificity tested in the laboratory.</p> <p>The developed SNP-tool consisted of species-specific 28 radish SNP-markers and 48 turnip rape SNP-markers. The results showed amplification of four radish SNP-markers in fertile individuals of turnip rape offspring, which located closest to the PPR-B gene region that restores fertility on the R9 chromosome. However, the SNP-tool could not determine whether integration occurred in fertile individuals of F1 hybrid offsprings, or whether the fertility restoring PPR-B gene region was unintegrated radish chromosome, as all SNP-tools turnip rape SNP-markers amplified in the turnip rape offsprings.</p> <p>The SNP tool cannot be utilized to develop turnip rape hybrid breeding method, because screening of integration would done to turnip rape F1 hybrids. In fertile individuals amplified radish SNP-markers could be used as DNA selection markers to identify the individuals with the PPR-B gene region, that restores fertility in F1 hybrids. In addition, the SNP-tool revealed, that the excess of extra radish chromosome is not complete in the genome.</p> <p>This research is part of a research project of the development of a hybrid breeding method for turnip rape, which is studying the utilization of cross breeding between closely related plant species in the breeding to turnip rape in cooperation with Boreal Plant Breeding Ltd.</p> |                              |   |
| Keywords<br>turnip rape, radish, relative relationships, hybrid breeding system, SNP marker  |                              |   |
| Where deposited<br>Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library   |                              |   |
| Further information<br>Supervisors Tarja Niemelä and Outi Manninen   |                              |   |

# Sisällys

|  |    |
|--|----|
| 1 JOHDANTO.....  | 6  |
| 2 BRASSICA JA RAPHANUS LAJIEN SUKULAISUhteet .....   | 7  |
| 2.1 Brassica U-kolmio teoria .....   | 8  |
| 2.2 Brassica ja Raphanus sukulaissuhteiden hyödyntäminen lajien välisissä risteytyksissä ..... | 11 |
| 2.2.1 Ogu-INRA cms/Rf-hybridijalostusmenetelmä .....   | 13 |
| 2.2.2 Retikan palauttajageeni Rfk.....   | 14 |
| 3 SNP-MERKIT .....   | 15 |
| 3.1 Fluidigm genotyypin analysointiohjelma .....   | 18 |
| 3.2 Sekvenssirinnastus BLAST-tietokantahakualgoritmillä .....                                  | 21 |
| 4 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET .....   | 25 |
| 5 AINEISTO JA MENETELMÄT .....   | 26 |
| 5.1 Tietokannan haku .....   | 26 |
| 5.2 Tietokantahaku BLASTN-ohjelmalla .....   | 27 |
| 5.3 SNP-työkalun testaaminen .....   | 28 |
| 5.3.1 Koejäsenet.....  | 28 |
| 5.3.2 DNA eristys .....  | 30 |
| 5.3.3 Fluidigm.....  | 31 |
| 6 TULOKSET .....   | 32 |
| 6.1 DNA tietokantojen käyttö.....  | 32 |
| 6.1.1 Tietokannan valinta.....   | 32 |
| 6.1.2 Tietokantahaku BLAST-ohjelmalla.....   | 35 |
| 6.2 SNP-työkalun testaaminen .....   | 38 |
| 6.2.1 Rypsin SNP-merkkien valinta .....  | 38 |
| 6.2.2 Kontrollit.....  | 39 |
| 6.2.3 Rypsin risteytysjälkeläistö .....  | 45 |
| 7 TULOSTEN TARKASTELU .....  | 51 |
| 7.1 DNA tietokantojen käytön arviointi .....   | 51 |
| 7.2 SNP-työkalu toimivuus.....   | 52 |
| 8 JOHTOPÄÄTÖKSET .....   | 54 |

|   |    |
|---|----|
| LÄHTEET .....                                     | 55 |
| LIITE 1: IUPAC NUKLEOTIDIKOODIT .....             | 66 |
| LIITE 2: SNP-TYÖKALUSSA KÄYTETYT SNP-MERKIT ..... | 67 |
| LIITE 3: RYPsin SNP-MERKKIEN VALINTA .....        | 70 |
| LIITE 4: KOEJÄSENTEN AJOLEVYKEJÄRJESTYS .....     | 73 |

## 1 JOHDANTO

Kotimainen rypsi on tärkeä raaka-aine suomalaiselle kasviöljyteollisuudelle. Suomessa vuonna 2019 kevätmuotoista rypsiä ja rapsia viljeltiin yhteensä noin 36 600 hehtaarilla, josta rypsin osuus oli noin 17 600 hehtaaria. Rypsi menestyy Suomen III-viljelyvyöhykkeelle asti eikä se tarvitse pitkää kasvukautta kypsyäkseen ja tuleentuaakseen niin kuin rapsi, jonka viljely painottuu enemmän eteläisempään Suomeen. Rypsin lajikejalostuksen tavoitteena on sadontuottokyvyn nostaminen, joka voidaan toteuttaa risteytyselinvoimaa eli heteroosia hyödyntävällä hybridijalostusmenetelmällä, mikä on jo käytössä rapsilla. Hybridijalostusmenetelmässä käytetään kahta vanhempainlinjaa, joista äitilinja on hedesteriili eli kyvytön tuottamaan hedelmällistä siitepölyä ja isälinja on fertiiliyden palauttava eli siitepölytuotannon palauttava. Hybridimenetelmässä äitilinja pölytetään siitepölyä tuottavalla isälinjalla, joka palauttaa fertiiliyden jälkeläisille. Rypsin hybridijalostusmenetelmään on tuotettu hedesteriili äitilinja mutta toimivan hybridijalostusmenetelmän toteuttamiseksi rypsillemme vielä tarvitaan fertiiliyden palauttavaa isälinjaa. Ratkaisua rypsillemme isälinjan toteuttamiseksi on lähdetty hakemaan rypsin ja rapsin lajien välisten risteytysten kautta *Brassica* ja *Raphanus* sukulaissuhteita hyödyntäen.

Sekvensointitekniikoiden kehitys on lisännyt koko genomin kattavia tutkimuksia ja ominaisuuksiin vaikuttavien geenien vaihtoehtoiset muodot eli alleeliset variaatiot on voitu havaita saman lajin eri genomeista. Alleelisten variaatioiden tutkimiseen on kehitetty geneettisiä työkaluja, joita kutsutaan molekyylimarkkereiksi. Yksittäisen emäksen vaihdokset (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ovat pistemutaatioita genomissa, mitä hyödynnetään molekyylimarkkereina kasvinjalostuksessa. Molekyylimarkkereilla voidaan nopeuttaa lajikejalostusta, kun jalostuksellisesti arvokas ominaisuus voidaan osoittaa molekyylimarkkereilla ja valita jatkoon parhaat yksilöt jalostusohjelmassa. *Brassica* ja *Raphanus* sukujen julkisesti saatavilla olevat DNA

emäsjärjestykset eli sekvenssit ovat mahdollistaneet lajispesifisten sekvenssi pohjaisten SNP-merkkien kehittämisen rypsilä ja retikalle, joita hyödynnettiin tässä tutkimuksessa.

Tämä tutkimus on osana Huoltovarmuuskeskuksen rahoittamaa Rypsin hybridimenetelmän kehittäminen-tutkimusprojektia, jota toteutetaan Tarja Niemelän johdolla yhteistyössä Boreal Kasvinjalostus Oy:n kanssa. Hankkeessa on keskitytty rypsin ja rapsin lajien väliseen risteyttämiseen, minkä avulla rypsilä saataisiin siirretyksi alun perin retikalta rapsille siirretty siitepölytuotannon palauttava PPR-B-geenialue ja tuotetuksi isälinja rypsin hybridijalostusmenetelmään. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää retikan ja rypsin SNP-merkkeihin perustuva työkalu, jolla tunnistettaisiin rypsin F1 hybridin risteytysjälkeläistöstä yksilöt, joilla fertiliteetin palauttava PPR-B-geenialue on integroitunut ylimääräisestä retikan kromosomista rypsin genomiin. Aiemmin hankkeessa fertiliteetin palauttavan retikan PPR-geenialueiden sijainti oli kohdennettu retikan R9-kromosomiin, minkä johdosta työssä keskityttiin R9-kromosomialueiden tunnistamiseen SNP-merkeillä.

## 2 BRASSICA JA RAPHANUS LAJIEN SUKULAISUUS- TEET

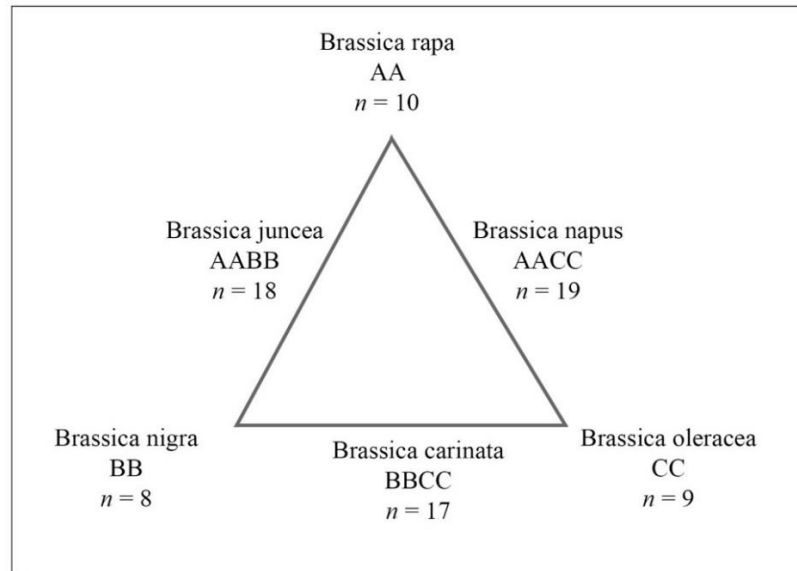
Ristikukkaiskasvien (*Brassicaceae*) heimoon kuuluvat kaalin (*Brassica*) ja retikan (*Raphanus*) suvut sisältävät taloudellisesti tärkeitä viljelykasveja, joita yleisesti viljellään eri puolilla maailmaa. Retikan suvun viljelykasvit ovat juureksia, joissa vaihtelevat pääjuuren muoto, väri ja pituus. Retikan suvun tunnetuin viljelykasvi on ruokaretikka (*Raphanus sativus*), josta on jalostettu erilaisia muunnoksia, kuten itämainen retiisi (*Raphanus sativus* var. *niger*), rotanhännäksi kutsuttu retiisi (*Raphanus sativus* var. *caudatus*) sekä viherlannoitteeksi välikasvina viljelty lehtiretiisi (*Raphanus sativus* var. *oleiformis*). Kaalin suvussa on useita viljelykasviryhmiä, jotka sisältävät erilaisia kaaleja, juureksia, öljy-, ja maustekasveja. Vihanneskaalista (*Brassica oleracea*) on jalostettu paljon muunnoksia, jotka jaetaan kerän, lehden, kukinnon ja

varsimukulan muodostaviin kaaleihin. Kaalin suvun tunnetuimmat juurekset ovat nauris (*Brassica rapa* ssp. *rapa*) ja lanttu (*Brassica napus* ssp. *rapifera*), joille lähisukua ovat öljykasveista rypsi (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*) ja rapsi (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). Kaalien sukuun kuuluvat myös mausteiden valmistuksessa käytetty mustasinappi (*Brassica nigra*) ja biopolttoaineiden tuotannossa raaka-aineena hyödynnetty sareptansinappi (*Brassica juncea*). *Brassica* lajien sukulaissuhteet kuvataan U-kolmio teoriassa ja molekyyli-pohjaisten tutkimusten avulla on voitu tarkemmin selvittää *Brassica* ja *Raphanus* lajien sukulaissuhteita.

## 2.1 Brassica U-kolmio teoria

*Brassica* lajien väliset sukulaissuhteet esitetään U-kolmio teoriassa, mikä on nimetty korealaisen botanistin Nagaharu U:n mukaan. U-kolmio teoria julkaistiin vuonna 1935 osana risteytystutkimusta, jossa osoitettiin *B. juncea*, *B. napus* ja *B. carinata* lajien syntyminen *B. rapa*, *B. nigra* ja *B. oleracea* keskenään risteytymisen kautta. Nämä kuusi *Brassica* lajin genomia on nimetty kirjaimin ja niiden suhteet kuvataan U-kolmiossa (Kuva 1). Diploidiset eli kromosomiluvultaan kaksiaannoksiset AA ( $2n = 20$ , *B. rapa*), BB ( $2n = 16$ , *B. nigra*) ja CC ( $2n = 18$ , *B. oleracea*) genomit muodostavat U-kolmion kärkipisteet. U-kolmion sivuilla ovat diploidisista lajeista risteytyneet allopolyploidiset AABB ( $2n = 36$ , *B. juncea*), AACC ( $2n = 38$ , *B. napus*) ja BBCC ( $2n = 34$ , *B. carinata*) genomit, joilla on kummankin kantalajin peruskromosomit kertautuneet.





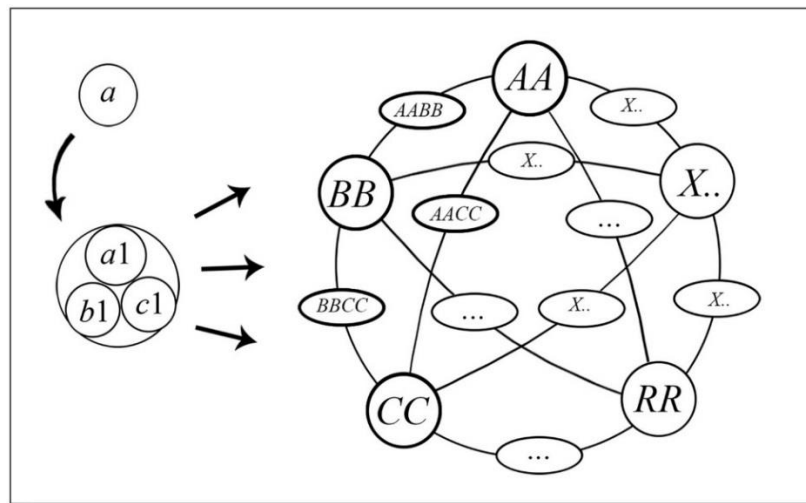
Kuva 1. U-kolmio teorian osoittamat kuuden *Brassica* lajin genomiset suhteet.

Kasvien polyploidian eli kromosomiston moninkertaisuuden tutkimuksissa *Brassica* suvun A, B ja C pangenomeita on käytetty mallina. Pan-genomi kuvastaa lajin kaikkia geenejä ja geneettisiä variaatioita. DNA-pohjaisten tutkimusten kohdennus *Brassica* suvun lajeihin on nopeuttanut DNA emäsjärjestyksien eli sekvenssien julkistamista. *Brassica* A genomien DNA-sekvenssi julkaistiin ensimmäisenä kiinankaalin (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) 'Chiifu 401-42' -lajikkeesta (Wang ym. 2011), jota on käytetty usein vertailevan genomiikan tutkimuksissa tutkittaessa muita *Brassica* suvun lajeja (Cheng ym. 2013). Seuraavana julkaistiin *Brassica* C genomista kaksi DNA-sekvenssiä: kaalin (*B. oleracea* var. *capitata*) 02-12 -linjasta (Liu ym. 2014) ja härmekaa- lin (*B. oleracea* var. *alboglabra*) linjasta (Parkin ym. 2014). *Brassica* A ja C genomien DNA-sekvenssin julkistamisen jälkeen *Brassica* AC genomien DNA-sekvenssi julkaistiin rapsin 'Darmor-bzh' -lajikkeesta (Chalhoub ym. 2014). *Brassica* B genomien DNA-sekvenssi on julkaistu mustasinapin (*B. nigra*) 'YZ12151' kaksoishaploidista (Yang ym. 2016), mutta BC genomien DNA-sekvenssiä ei ole vielä julkaistu.

*Brassica* A, B ja C genomien DNA-sekvenssien julkinen saatavuus on mahdollistanut genomien vertailun ja tarkemmin on voitu tutkia niiden yhteneväistä rakennetta. Eri genomien vertailussa pyritään löytämään DNA-sekvenssien samankaltaisuuksia ja havainnoimaan evoluution aiheuttamia muutoksia, jotka ovat muotoilleet genomien rakennetta ja sisältöä. Genomiin kerrääntyy DNA-sekvenssin muutoksia, joista voidaan päätellä lajien esigenomista rakennetta sekä kulunutta aikaa, milloin DNA-sekvenssin muutos on tapahtunut. Molekyyliopohjaisten tutkimusten avulla on osoitettu *Brassica* A, B ja C genomien lajiutuminen yhteisestä heksaploidisesta eli kromosomistoltaan kuusiannoksisesta *Brassicaceae* esigenomista (Lysak ym. 2005). *Brassicaceae* esigenomista lajiutumisen seurauksena *Brassica* A, B ja C koko genomi on kolminkertaistunut (Lysak ym. 2005), minkä jälkeen *Brassica* A, B ja C genomit ovat muodostuneet diploideiksi, jotka on kuvattu U-kolmio teoriassa.

*Raphanus* suvun lajien genomit ovat diploidisia ja ne on nimetty R-kirjaimella. *Raphanus* R genomista ( $2n = 18$ ) on julkaistu useita DNA-sekvenssejä ja uusin julkaisu on retikan (*R. sativus*) 'WK10039' -lajikkeesta (Jeong ym. 2016). *Raphanus* ja *Brassica* lajien DNA-sekvenssejä vertailemalla on havaittu *Raphanus* R genomien sisältävän yhteneväisiä alueita *Brassica* A, B ja C genomien kanssa (Cheng ym. 2013). *Raphanus* R genomien on päätelty lajiutuneen samasta heksaploidisesta *Brassicaceae* esigenomista (Cheng ym. 2013). Tämän havainnon pohjalta Cheng ym. (2017) laajensivat U-kolmio teorian monikulmamalliksi ja lisäsivät *Raphanus* R genomien neljänneksi kärjeksi (Kuva 2). Perusta monikulmamallille on yhteisestä esigenomista lajiutuminen. Monikulmamalli osoittaa allopolyploidisten *Brassica* AB, AC ja BC genomien suhteet diploideihin *Brassica* A, B ja C genomeihin ja niiden yhteyden diploidiseen *Raphanus* R genomiin, mutta jättäen yhden monikulmamallin kärkipisteistä avoimeksi. Evoluutio tutkimuksissa on selvitetty *Eruca sativa* (sinappikaali) diploidisen EE genomien ( $2n = 22$ ) läheisempi liittyminen *Brassica* sukuun sekä *R. sativus* lajin genomeihin (Wang ym. 2014), mikä viittaa *Eruca* E genomien lajiutumiseen yhteisestä *Brassicaceae* esigenomista

*Brassica* lajien kanssa ja mahdollisuuteen, että E genomi voi olla yksi monikulmamallin kärkipisteistä. Monikulmamalli osoittaa mahdolliset risteytymiset ja sukulaissuhteiden hyödynnettävyyden. Lajien välisessä risteyttämisessä samankaltaiset alueet DNA-sekvenssissä helpottavat kromosomialueiden siirtymistä (Leflon ym. 2006), jolloin eri ominaisuuksia voidaan siirtää lajien välisissä risteytyksissä sukulaissuhteita hyödyntäen.



Kuva 2. *Brassiceae* esigenomin moninkertaistuminen ja U-kolmio teorian laajentuminen monikulmamalliksi, joka on vielä avoin järjestelmä. Ympyröiden sisään ovat merkittynä *Brassica* ja *Raphanus* genomien kirjaimet, mistä lähtevät viivat kuvaavat eri genomien välisiä suhteita. Monikulmamallin viidennen kärjen ympyrään on merkitty X-merkki ja siitä lähtevät X-merkit kuvaavat vielä selvittämättömän lajin puuttumista. Pistemerkinnät ympyröissä kuvaavat *Brassica* ja *Raphanus* genomien yhdistymistä ja osoittavat mahdolliset, vielä tuntemattomat allotetraploidit lajit.

## 2.2 *Brassica* ja *Raphanus* sukulaissuhteiden hyödyntäminen lajien välisissä risteytyksissä

*Brassica* suvun lajien välisiä risteystutkimuksia on tehty paljon ja onnistuneita risteytyksiä ovat olleet *B. rapa* x *B. napus* ja *B. rapa* x *B. juncea* lajien välillä. *Brassica* suvun lajien välisellä risteyttämisellä on saatu siirretyksi eri ominaisuuksia, kuten sadon muodostuksen aikaisuutta (Akbar 1989),

keltaista siemenväriä (Chen 1988), itsesiitoksen estoa (Rahman 2004) ja muutettua erukahapon ja glukosinolaattien pitoisuuksia (Stefansson ja Downey 1995). Jo ennen *Brassica* ja *Raphanus* sukujen DNA-sekvenssien julkaisemista, sukuja on risteytetty keskenään. Näistä onnistuneita risteytyksiä ovat olleet esimerkiksi *R. sativus* x *B. rapa* (Ellerström 1978), *R. sativus* x *B. napus* (Paulmann ja Röbbelen 1988) *R. sativus* x *B. oleracea* (Gupta 1997), *R. sativus* x *B. juncea* (Rhee ym. 1997).

Risteytymistä ohjaavien erilaisten mekanismien ja geenitekniikan tuntemus auttavat kasvinjalostajia siirtämään haluttuja geenejä läheisten lajien välillä (Snowdon 2007, Nicolas ym. 2008, Wijnker ja de Jong 2008). Sytoplasminen koirassteriliteetti (Cytoplasmic Male Sterility, CMS) on löydetty yli 150 kasvilajilta, mikä tuottaa kasvista hedesteriilin eli kyvyttömän tuottamaan elävää siitepölyä (Wise ja Pring 2002). Kasvinjalostusmenetelmissä hyödynnetään CMS-ominaisuutta, joka siirtyy läheisten lajien välillä. Ristikukkaiskasveilla on tutkittu yli viittä eri CMS-ominaisuutta (Pelletier ja Budar 2015), joista japanilaiselta retikalta löydettyä Ogura-tyypin CMS-ominaisuutta (Ogura 1968) on testattu eniten kehitettäessä eri lajeille hybridijalostusmenetelmää. Japanilaiselta retikalta löydetty Ogura-tyypin CMS-ominaisuus on siirretty *B. oleracea* lajille *R. sativus* x *B. oleracea* välisellä risteyttämisellä, minkä jälkeen *B. oleracea* kromosomimäärä on palautettu useiden takaisinristeyttämiskertojen avulla (Bannerot ym. 1974). *B. napus* lajille Ogu-CMS-ominaisuus on saatu siirretyksi alkion viljelytekniikalla (Bannerot ym. 1977).

Lajien välisissä risteytyksissä siltaristeytystä voidaan hyödyntää halutun ominaisuuden siirrossa. Siltaristeyttämisessä polyploidisten lajien lisääntymiskykyä hyödynnetään kromosomien määrän lisäämiseksi. Tämän jälkeen haluttu ominaisuus on helpommin siirrettävissä kohdekasviin lisääntyneiden kromosomiparien avulla (Comai 2005). Siltaristeyttämistä on hyödynnetty retikan Ogu-CMS-ominaisuuden siirrossa, jossa Ogu-CMS-ominaisuus on ensin

siirretty retikalta rapsille ja tämän jälkeen ominaisuus on siirretty rapsilta ryp-sille (Sovero 1987, Delourme 1994).

### 2.2.1 Ogu-INRA cms/Rf-hybridijalostusmenetelmä

CMS-ominaisuuden tuottavat mitokondriongeenit ehkäisevät kasvia muodostamasta elävää siitepölyä (Wise ja Pring 2002). Elävän siitepölyn tuotto eli fertiilisyys voidaan palauttaa kasville tumangeenien avulla (Heyn 1976), mitkä ovat fertiiliyden palauttavia (restorer fertility, Rf). Hybridisiemenen-tuotannon risteytyksissä isän tumasta saadut dominantit palauttajageenit es-tävät äidiltä saatujen mitokondriogeenien muodostaman CMS-ominaisuuden, jolloin risteytysjälkeläisten (F1-hybridi) fertiiliys palautuu normaaliksi. Hyb-ridijalostusmenetelmässä hyödynnetään risteytyksiin yhteensopivia CMS-, ja Rf-linjoja, joiden F1-hybrideillä heteroosi ilmenee yleensä sadonlisänä. Pel-toviljelyssä siitepölytön CMS-äitilinja pölyttyy viereen kylvetystä siitepölyä tuottavasta Rf-isälinjasta, jolloin CMS-äitilinjan kukat ovat 100 % pölytty-neet Rf-isälinjan siitepölyllä ja jälkeläiset ovat F1 hybridejä. CMS/Rf hybri-dijalostusmenetelmä mahdollistaa kahden linjan risteytymisen peltomittakaa-vassa ja fertiiliyden palauttamisen F1-hybridi jälkeläisille.

Fertiiliyden palauttavia tumangeeneja on löydetty useita, joita on siirretty la-jien välisellä risteyttämällä sekä hyödyntäen siltaristeytystä geenien siir-rossa. Eurooppalaisen retikka lajikkeen fertiiliyden palauttava *Rfo*-geeni (Bonnet 1975) on siirretty Ogu-CMS-ominaisuuden sisältävän rapsin geno-miin (Heyn 1976). *Rfo*-geenin siirto rapsille tehtiin retikan ja rapsin synteet-tisellä risteyttämällä tuottaen Raphanobrassica-linja (*R. sativus* x *B. napus*;  $2n = 56$  AACRR) (Heyn 1976), joka risteytettiin Ogu-CMS-ominaisuuden sisältävän rapsin kanssa. Raphanobrassica-linjan ja Ogu-CMS-rapsin ristey-tyksessä rapsille siirtyi *Rfo*-geenin lisäksi retikan genomista kromosomialu-eita, jotka tuottivat rapsille korkean glukosinolaatti pitoisuuden (Delourme ym 1998). Institut national de la recherche agronomique (INRA, Ranska)

poisti pitkällä jalostustyöllä rapsin genomista retikan kromosomialueita ja tuotti rapsin hedesteriilin äitilinjan. Lisäksi INRA tuotti rapsin palauttajalinjaisen isälinjan, joita yhdessä äitilinjan kanssa kutsutaan Ogu-INRA cms/Rf-hybridisiementuotantosysteemiksi (Delourme ym. 1991, 1995, Primard-Brisson ym. 2005). Ogu-INRA cms/Rf-hybridisiementuotantosysteemi on lupaa-  
vin systeemi rypsin hybridisiemenjalostamiseen (Niemelä, 2013). Rypsil-  
le on tuotettu hedesteriili äitilinja hybridisiementuotantoon (Niemelä, 2013), mutta toimivan hybridimenetelmän kehittämiseksi tarvitaan myös siitepölytuotannon palauttava isälinja. Rypsil-  
le siitepölytuotannon palauttava isälinja tuottamiseksi on lähdetty hyödyntämään rypsin ja rapsin lajien välisiä risteytyksiä, jolla rypsil-  
le saataisiin siirretyksi retikan palauttajageeni *Rfk*.

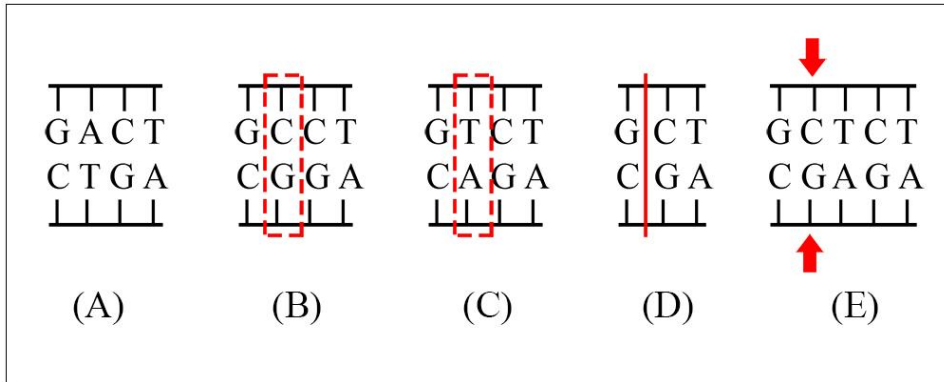
### 2.2.2 Retikan palauttajageeni *Rfk*

Eurooppalaisen retikka lajikkeen fertiiliyden palauttava *Rfo*-geeniä ei ole saatu siirtymään rapsin AC genomista rypsin A genomiin (Niemelä ym. 2010), koska retikalta *Rfo*-geeni siirtyi rapsin C genomien kromosomiin (Hu ym. 2008, Feng ym. 2009). Japanilaisen retikan 'Kosena' -lajikkeelta on löydetty fertiiliyden palauttava *Rfk*-geeni, joka on soluseinättömien kasvisolun-  
tumien yhdistämisellä eli protoplastifuusiolla siirretty rypsil-  
le (Sakai ym. 1996). *Rfo*-, ja *Rfk*-geeni ovat geneettisesti samanlaiset ja molemmat sisältävät kolme geeni tandemia, PPR-A, PPR-B ja PPR-C (pentatricopeptide repeat). Näistä PPR-B geenin on osoitettu palauttavan fertiiliyden (Brown ym. 2003, Desloire ym. 2003, Uyttewaal ym. 2008), muun muassa rapsilla (Hawliczek-Strulak ym. 2015). Plantech Research Instituutin jalostama rapsin jalostuslinja RfA4 sisältää fertiiliyden palauttavan PPR-B geenialueen, mutta se sijaitsee todennäköisesti ylimääräisessä retikan kromosomissa (Niemelä, 2013) eikä PPR-B alue ole liittynyt rapsin A tai C kromosomeihin. Helsingin yliopisto on jalostanut rypsin palauttajalinjan (R-linja) 4021-2 *Rfk*, jonka genomissa on havaittu ylimääräinen retikan kromosomi tai kromosomin osa. Retikan kromosomi esiintyy rypsin R-linjan 4021-2 *Rfk* genomissa, joko monosomisena ( $2n=2x=20+1R$ ) tai disomisena ( $2n=2x=20+2R$ ) (Niemelä 2011).

Niemelä ym. (2012) tutkimuksessaan vertasivat *Rfo*-geenin sisältävää retikan BAC64 kloonin (AJ550021.2) (Bacterial Artificial Chromosome) *B. rapa* ssp. *pekinensis* genomiin (Wang ym. 2011). Retikan BAC64 kloonille löytyi 45% vastaavuus A9-kromosomissa sijaitsevasta *B. rapa* ssp. *pekinensis* BAC-kloonin KBrB025K04:sta (AC189288.2) (Niemelä ym. 2012). Lisäksi Niemelä ym. (2012) tutkimuksessaan vertasivat retikan BAC64 kloonin rypsin palauttajalinjan 4021-2 RfA A9-kromosomiin ja havaitsi niiden välillä samankaltaisia alueita. Samankaltaiset alueet A, C ja R kromosomeissa rypsin jalostuslinja RfA4:lla ja rypsin R-linja 4021-2 RfA:lla mahdollistavat tekijäin vaihdunnan risteytymisessä (Niemelä ym. 2012). Risteytysohjelmassa rypsin ja rypsin lajien välisellä risteyttämisellä retikalta alkuperää oleva PPR-B-geenialueen on mahdollista liittyä rypsin A9-kromosomiin.

### 3 SNP-MERKIT

DNA-jaksossa vuorottelevat neljä emästä; adeniini (A), guaniini (G), sytosiini (C) ja tymiini (T), joista A ja G ovat puriineita sekä C ja T ovat pyrimidiineja. Yhden emäksen eli nukleotidin muuttumista DNA-jaksossa kutsutaan yhden nukleotidin vaihdokseksi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Nukleotidien vaihdokset luokitellaan siirtymäksi (transitio), kääntymäksi (transversio), yksittäisen nukleotidin puuttumaksi (deleetio) sekä yksittäisen nukleotidin liittymäksi (insertio) (Kuva 3). Transitiossa vaihdos tapahtuu puriini-puriininukleotidien ( $A \leftrightarrow G$ ) kesken (Kuva 3, B) tai vaihdos tapahtuu pyrimidiini-pyrimidiininukleotidien ( $C \leftrightarrow T$ ) kesken. Transversiossa puriini-nukleotidi vaihtuu pyrimidiininukleotidiin tai pyrimidiininukleotidi vaihtuu puriininukleotidiin ( $C/T \leftrightarrow G/A$ ) (Kuva 3, C). Deleetiossa yksittäinen nukleotidi puuttuu DNA-jaksosta (Kuva 3, D). Insertiossa yksittäinen nukleotidi on liittynyt DNA-jaksoon (Kuva 3, E). Suurin osa SNP:stä ovat bialleelisia eli kaksi nukleotidia vaihtoehtoisesti esiintyy SNP kohdassa. SNP:t voivat olla myös kolmi-, ja nelialleelisiä, jolloin SNP kohdassa vaihdunta tapahtuu useamman nukleotidin kesken (Brookes 1999).



Kuva 3. DNA-jakson yhden nukleotidin vaihdos. (A) Villityyppi. (B) Siirtymä, jossa adeniini on vaihtunut siirtymänä sytosiiniksi. (C) Kääntymä, jossa adeniini on vaihtunut kääntymänä tyymiiniksi. (D) Puuttuminen (deleetio). (E) Liittyminen (insertio).

Genomisekvenssien julkinen saatavuus on mahdollistanut tutkia sekvenssimuunnelmia yksilöiden, lajikkeiden ja alalajien välillä. Sekvenssimuunnelmia löydetään populaation yksilöiden DNA-segmenttien eli lyhyiden DNA-sekvenssi alueiden monistamisella polymeraasiketjureaktiolla (PCR), jota seuraa monistettujen alueiden sekvenssivertailu ja SNP-kohdan tunnistaminen (Clegg ja Gaut 1993, Bell ym. 1990). Ilmenevän geenin osaa (expressed sequence tag, EST) on käytetty SNP-kohdan kehittämiseen, jolloin SNP:n sijaitessa geenin koodaavalla tai promootorialueella vaihtuva nukleotidi voi vaikuttaa geenin toimintaan (Paris 2003). EST:n komplementaarisen DNA-kloonin 3'-päässä oleva 3'-UTR (Untranslated Transcribed Region) maksimoi mahdollisuuden löytää sekvenssimuunnelmia, kun EST-sekvenssistä tuotetuilla alukepareilla monistetaan populaation yksilöiden DNA-segmenttejä. Lisäksi EST:jä voidaan käyttää ryhmänä vastaavien alueiden monistamiseen eri lajikkeista, jolloin mahdolliset SNP:t tunnistetaan laskennallisesti. DNA-jaksossa SNP:t ovat yleisempiä pistemutaatiokohtia, sillä niitä esiintyy myös geenejä ei-koodaavilla alueilla. Seuraavan sukupolven sekvensointitekniikoiden avulla SNP:jä löydetään paljon (Duran ym. 2009). Yu yms. (2002) vertailivat eri riisi lajien sekvenssejä ja tunnistivat yhden SNP:n keskimäärin 170 emäsparin (bp) välein sekä yhden insertio/deleetio (InDel) -kohdan 540 bp:n välein.



SNP:jä käytetään molekyylimarkkereina eli SNP-merkkeinä. SNP-merkit soveltuvat geenien ja genomin laajuisiin assosiaatiotutkimuksiin (GWAS), missä ominaisuuksiin vaikuttavien geenien vaihtoehtoisia muotoja eli alleleja koitetaan tunnistaa. Lisäksi SNP-merkkejä voidaan käyttää myös työkaluna kartoittamiseen, merkkiavusteiseen jalostamiseen ja karttapohjaiseen kloonaukseen (Gupta ym. 2001, Rafalski A. 2002, Batley ym. 2003). SNP-merkit ovat suosittuja, koska SNP-merkin sijaitessa vaikuttavassa geenissä tai sen lähellä, sitä voidaan käyttää valinnan apuvälineenä lajikejalostuksessa. Esimerkiksi *B. rapa* lajin siemenväriin tuottavan geenin läheltä on löydetty SNP:jä (Rahman ym. 2007), jolloin lajikejalostuksessa siemenväriin tuottavan geenin siirtymistä voidaan havainnoida SNP-merkkien avulla.

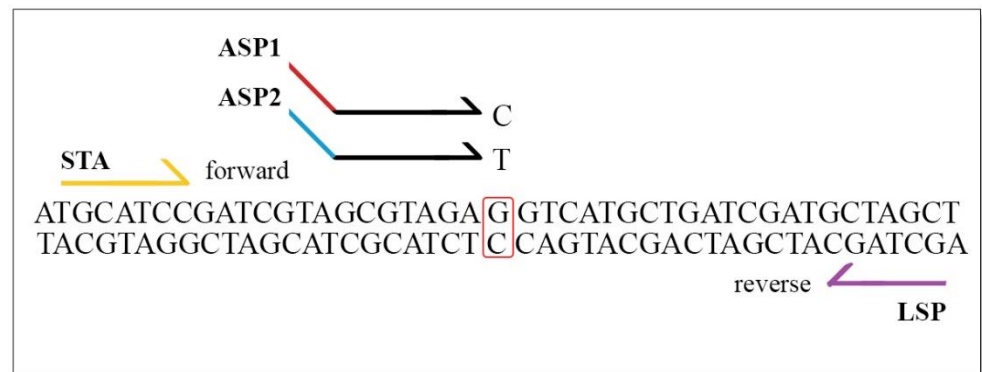
Useista samassa kromosomissa sijaitsevista SNP-merkeistä voidaan muodostaa geneettinen kartta, jossa SNP-merkit kattavat lyhyin välein koko genomin. SNP-merkeistä koostuvaan geneettistä karttaa on usein täydennetty kartoittamalla siihen esimerkiksi BAC (Bacterial Artificial Chromosome) SNP-merkkejä, jotka voivat olla tuotettu eri lajin genomista ja kartoitettu kuuluvaksi myös kartoitettavalle lajille. Geneettisessä kartassa merkkien välinen etäisyys merkitään senttimorgan (cM) matemaattisella arvolla. Yksikkö on nimetty Thomas H. Morganin mukaan, joka tutki banaanikärpäsiä (*Drosophila melanogaster*) ja kehitti geneettisiin tutkimuksiin rekombinaatiofrekvenssiin perustuvan yksikön. cM yksikköä käytetään osoittamaan toisiaan vastaavien DNA-segmenttien kokoa, missä poikkeavuuksien keskimääräinen lukumäärä yhden sukupolven aikana on 0,01 eli yksi prosentti. Tutkimuksissa geneettisen kartan avulla havainnoidaan lajin evoluution tapahtumia, genomirakennetta sekä geneettistä karttaa hyödynnetään esimerkiksi viljelyominaisuuksiin vaikuttavien geenien tutkimisessa. Geneettisiä karttoja on julkaistu useille kasvilajeille, kuten retikalle (Mun ym. 2015), jota käytettiin tässä tutkimuksessa.

SNP-merkkien genotyypitysmenetelmiä on laaja valikoima, mutta kaikissa menetelmissä toistuu sama menettely. Ensin tuotetaan alleelispesifinen tuote SNP-merkin tunnistamiseksi, minkä jälkeen tuotteelle tehdään analyysi. Vignal ym. (2002) luokitteli SNP-merkkien genotyypitysmenetelmät suoriin hybridisaatiotekniikoihin sekä tekniikoihin, jotka sisältävät sukupolven ja alleelispesifisen tuotteen erottelun. SNP-merkin genotyypin määrittämisessä yleisiä tekniikoita ovat geelielektroforeesi, fluorometria, DNA-siru ja MALDI-TOF-massaspektrometria (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight) (Khlestkina ym. 2006, Shirasawa ym. 2006). Myöhemmin Sobrino ym. (2005) osoittivat, että suurin osa SNP-merkkien genotyypimäärittämisestä voidaan jakaa molekyylimekanismiin perustuen neljään pääryhmään: alleelispesifinen hybridisaatio, aluke pidennys, oligonukleotidisidos ja invasiivinen eli kajoava pilkkominen. Alleelispesifinen hybridisaatio tunnetaan myös nimellä alleelispesifinen oligonukleotidihybridisaatio (ASO), jossa genotyypit voidaan päätellä hybridisaatiosignaaleista. Menetelmässä hyödynnetään leimatun oligonukleotidin hybridisaatiota, missä suunnitellaan SNP-merkille optimoidut kaksi alleelispesifistä (AS) aluketta erottamaan DNA:ssa kaksi kohdealuetta hybridisaation avulla (Wallace ym. 1979, Wangkumhang ym. 2007). Alukkeiden suunnittelussa käytetään esimerkiksi Prim-SNPing (Chang ym 2009) ja Primer-BLAST (Coulouris ym. 2009) ohjelmia. Useat eri valmistajat tuottavat välineistöä SNP-merkkien määrittämiseen ja myös tarjoavat alukkeiden suunnittelua SNP-merkeille.

### 3.1 Fluidigm genotyypin analysointiohjelma

Fluidigm Corporation on yksi bioinformatiikan välineistövalmistaja, jolla on useita rekisteröityjä tavaramerkkejä, kuten Fluidigm, Fluidigm Biomark, EP1 ja Dynamic Array. Tässä tutkielmassa käytettiin Fluidigm EP1 <sup>TM</sup> digitaalista PCR-analyysia (dPCR), joka on menetelmänä samanlainen kuin reaaliaikainen (kvantitatiivinen) PCR (qPCR). Fluidigm EP1 <sup>TM</sup> on loppupisteen PCR-analyysijärjestelmä, missä SNP-merkille suunnitellaan lokusspesifinen aluke (Locus Specific Primer, LSP), spesifinen aluke kohdeamplifikaatiolle

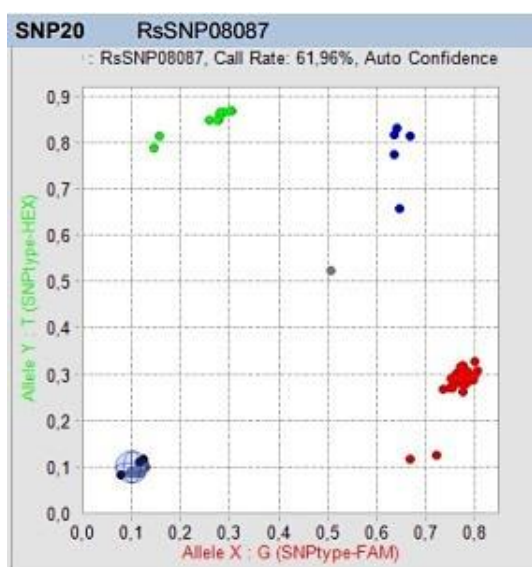
(Specific Target Amplification Primer, STA) ja kaksi alleelispesifistä aluketta (ASP1, ASP2) (Kuva 4). LSP-, ja STA-alukkeet on suunniteltu tunnistamaan SNP-merkin kohdealueen eri suunnista DNA:ta. LSP-aluke tunnistaa SNP-merkin kohdealueen DNA:n reverse-suunnasta ja STA-aluke forward-suunnasta. Kun LSP-, ja STA-alukkeet ovat tunnistaneet SNP-merkin kohdealueen, alleelispesifiset alukkeet voivat kiinnittyä SNP kohtaan DNA:n forward-suunnasta.



Kuva 4. SNP-merkin kohdealueen DNA:sta tunnistavat reverse-suuntaan suunniteltu lokusspesifinen aluke (LSP) ja forward-suuntaan suunniteltu spesifinen kohdeamplifikaation (STA) aluke. Väriaineella fluoresoidut oligot hybridisoituvat alleelispesifisten oligojen 5'-päihin, mitkä toimivat koettimina SNP alleeleille. SNP-kohdassa vain ASP1-aluke sitoutuu DNA:ssa olevan guaniinin (G) kanssa. Fluoresenssin intensiteettimittauksessa havaitaan monistuminen vain ASP1-alukkeen avulla, jolloin kuvan SNP-genotyyppi on homotsygoottinen ASP1-alleelin suhteen.

Alleelispesifisten alukkeiden 5'-pää on leimattu punaista sekä vihreää väriä fluoresoivalla aineella (Fluoreseiini-amidiitti, FAM, Heksakloori-Fluoreseiini, HEX). Reaktioseoksessa oleva oligo voi hybridisoitua alukkeen leimattuun päähän ja fluoresointi alkaa vasta, kun hybridisaatio tapahtuu. Fluoresenssin voimakkuuden (intensiteetin) mittauksella määritetään SNP-merkillä monistuneiden yksilö näytteiden SNP-genotyyppi (XX, YY, XY).

Fluidigm EP1™ PCR-analyysijärjestelmän tuloksia tulkitaan Fluidigm genotyypin analysointiohjelmalla. Ohjelma kokoaa genotyypimääritys tulokset yhteenvedo raportiksi, jossa graafisesti on esitetty SNP-merkkien värilliset genotyyppipistekartat fluoresenssi-intensiteetti mittauksesta (Kuva 5).



Kuva 5. Esimerkki retikan SNP-merkin (RsSNP08087) tuloksesta rypsiaineistossa. Fluidigm genotyypin analysointiohjelma kokoaa genotyypimääritys tulokset genotyyppipistekartaksi fluoresenssi-intensiteetti mittauksesta. Kartassa X-akselilla on FAM merkattu alleelispesifinen alue ja Y-akselilla HEX. SNP-merkillä monistuneet näytteet ovat värillisiä pisteitä kartalla, missä vihreät pisteet ovat homotsygoottisia SNP-merkin HEX merkatulle alleeli Y:lle, joka tällä esimerkki SNP-merkillä on tyymiini (T). Punaiset pisteet ovat homotsygoottisia SNP-merkin FAM merkatulle alleeli X:lle, joka tällä esimerkki SNP-merkillä on guaniini (G). Siniset pisteet ovat heterotsygoottisia SNP-merkin X ja Y alleeleille. Analyysissa käytetyt negatiiviset kontrollit (No Template Control, NTC) ovat mustia pisteitä, joiden tulee sijaita kartan vasemmassa alakulmassa olevassa ympyrässä. Harmaat pisteet ovat No call-näytteitä eli ohjelma ei ole pystynyt määrittämään näytteelle genotyyppiä.

SNP-merkki kartan X-akselilla on FAM merkattu alleelispesifinen alue ja Y-akselilla HEX. Kartalla punaisen värinen piste kuvastaa näytteen olevan homotsygoottinen FAM merkatulle alleeli X:lle, vihreän värinen piste kuvastaa näytteen olevan homotsygoottinen HEX merkatulle alleeli Y:lle ja sinisen

värinen piste kuvastaa näytteen olevan molempien alleelien yhdistelmä eli heterotsygoottinen XY. Kartan vasemmassa alakulmassa olevassa ympyrässä tulisi sijaita kaikki analyysissa käytetyt negatiiviset kontrollit (No Template Control, NTC) eli mustat pisteet. Jos useamman NTC:n sijainti on muualla, SNP-merkin tulosta ei voida tulkita luotettavasti. Kartalla harmaat pisteet ovat ohjelman määrittelemiä No call-näytteitä eli ohjelma ei ole pystynyt määrittämään näytteelle genotyyppiä, koska näyte alittaa käyttäjän asettaman raja-arvon fluorenssisignaalin. Ohjelman määrittämiä genotyyppi tuloksia käyttäjä voi muokata, esimerkiksi luokitella harmaan pisteen kuuluvaksi yhteen kolmesta genotyypistä. Käyttäjän tekemä muokkaus muuttaa näytteen pisteen muodon vinokuutioksi kartalle, mikä erottaa käyttäjä tekemät muokkaukset ohjelman määrittelemistä tuloksista.

### 3.2 Sekvenssirinnastus BLAST-tietokantahakualgoritmeilla

Koko genomin kattavia tai vain pieniä DNA-, ja RNA-fragmentteja sekvensoimalla tuotetaan sekvenssidataa, joka tallennetaan tietojenkäsittelymenetelmien avulla yksinkertaiseen FASTA-tiedostomuotoon (Lipman ja Pearsoinin 1985). Tallennuksessa käytetään IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) nukleotidikoodeja (Liite 1). Eri organisaatiot kokoavat tiedostoja tietokannoiksi, jotka päivittyvät, kun uusia tiedostoja julkaistaan. Yhdysvaltalainen National Center for Biotechnology Information (NCBI) kokoaa julkisesti saatavilla olevat eri organismiryhmien DNA-sekvenssi tiedostot GenBank tietokantaa. GenBank on mukana kansainvälisessä nukleotidisekvenssitietokanta yhteistyössä Japanin DNA-tietopankin (DNA Data Bank of Japan, DDBJ) ja Euroopan nukleotidiarkiston (European Nucleotide Archive, ENA) kanssa.

Eri alojen tutkimuksissa hyödynnetään tietokantoja, joista haetaan sekvenssejä tietokoneavusteisesti mallintamalla (*in silico*). BLAST-ohjelma (The Basic Local Alignment Search Tool) on *in silico*-mallinnus ohjelma eli tietokantahakualgoritmi, mikä on tarkka löytämään sekvenssien samankaltaisuuksia

(Altschul 1990). Tässä tutkielmassa käytettiin BLAST-ohjelman verkkoversiota (Kuva 6), joka on käytettävissä NCBI:n verkkosivustolla (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). BLAST-ohjelman voi lisätä tutkimusryhmän verkkosivustolle ja asettaa BLAST-ohjelman hakemaan vain tutkimusryhmän julkaisemasta sekvenssitiedostosta. NCBI päivittää oman verkkosivustonsa BLAST-ohjelman versiota, jossa on valittavissa standarttiset Nukleotidi BLAST (blastn) tai Proteiini BLAST (blastp) ohjelmat. Näistä on kehitetty useita versioita kuten, blastx, tblast ja tblastx. Suosituksena on, että blastn-ohjelmalla haetaan nukleotideistä koostuvaa hakusekvenssiä nukleotidisekvenssi-tietokannasta ja vastaavasti blastp-ohjelmalla haetaan vastaavuutta proteiini-hakusekvenssille proteiinitietokannasta. Sekvenssirinnastuksessa BLAST-ohjelma rinnastaa hakusekvenssin tietokantaan ja etsii vastaavuuksia tietokannasta käyttäjän asettamien parametrien mukaisesti. Sekvenssirinnastusta voi kohdentaa toimintoasetusten avulla hakusekvenssin pituudelle sopivaksi. Esimerkiksi 'similar blast'-toiminnolla voi hakea vain seitsemän nukleotidin pituista sekvenssiä. 'megablast'-toiminto on 'similar blast'-toimintoa nopeampi, koska 'megablast'-toiminto sallii hakusekvenssin yhteensopimattomuuden tietokantaan ja jättää etsinnässä huomiotta joitain hakusekvenssin nukleotidejä. Sekvenssirinnastuksessa 'megablast'-toiminto soveltuu eri lajista alkuperää olevan hakusekvenssin etsimiseen toisen lajin tietokannasta.

U.S. National Library of Medicine | NCBI National Center for Biotechnology Information | Sign in to NCBI

**BLAST®** » blastn suite | Home | Recent Results | Saved Strategies | Help

**Standard Nucleotide BLAST**

blastn | blastp | blastx | tblastn | tblastx

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#) [Reset page](#) [Bookmarks](#)

**Enter Query Sequence**

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#) [Clear](#) [Query subrange](#)

From  To

Or, upload file [Valitse tiedosto](#) [Ei valittua tiedostoa](#) [?](#)

**Job Title**

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

☐ **Align two or more sequences** [?](#)

**Choose Search Set**

**Database** ☐ Human genomic + transcript ☐ Mouse genomic + transcript ☒ Others (nr etc.):  
Nucleotide collection (nr/nt) [?](#)

**Organism** [Optional](#)  
Brassica rapa (taxid 3711) [exclude](#) [+](#)  
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown [?](#)

**Exclude** [Optional](#)  
☐ Models (XM/XP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

**Limit to** [Optional](#)  
☐ Sequences from type material

**Entrez Query** [Optional](#)  
Enter an Entrez query to limit search [?](#) [YouTube](#) [Create custom database](#)

**Program Selection**

**Optimize for**

☒ Highly similar sequences (megablast)  
☐ More dissimilar sequences (discontiguous megablast)  
☐ Somewhat similar sequences (blastn)  
[Choose a BLAST algorithm](#) [?](#)

**BLAST** | Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)  
☐ Show results in a new window

[Algorithm parameters](#)

Kuva 6. National Center for Biotechnology Information verkkosivuston BLAST -tietokantahakualgoritmin verkkoversio (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Hakusekvenssi syötetään Enter Query Sequence laatikkoon ja organismi kohdasta valitaan haluttu laji, josta hakusekvenssille rinnastusta haetaan. Sivun alaosasta valitaan optimointi et-sinnälle ja algoritmin parametrit.

Sekvenssirinnastukseen lisätään kohdennustehokkuutta BLAST-ohjelman pisteytysmatriiseilla, jotka perustuvat eri tilastollisiin todennäköisyyslaskentoihin. Dayhoff ym. (1978) suunnittelivat ensimmäisen pisteytysmatriisin (Accepted Point Mutation, PAM250). Myöhemmin Henikoff ja Henikoff (1992) suunnittelivat PAM matriisia herkemmän ja tarkemman BLOSUM62 (Blocks Substitution Matrix) matriisiin. Sekvenssirinnastuksessa matriisit painottavat eri asioita, kuten hakusekvenssin fyysistä sijaintia, jolloin hakusekvenssiä etsitään käännteisenä tietokannasta.

| Sequences producing significant alignments:                  |  |  |  | Score<br>(bits) | E<br>Value |
|--|--|--|--|-----------------|------------|
| Brapa_Chiifu_v1.0 A09 13 BGIScaffold000057 - 2009-08-13      |  |  |  | <u>54</u>       | 2e-07      |
| Brapa_Chiifu_v1.0 A09 26 BGIScaffold000045 - 2009-08-13      |  |  |  | <u>36</u>       | 0.055      |
| Brapa_Chiifu_v1.0 A08 18 BGIScaffold000010 + 2009-08-13      |  |  |  | <u>32</u>       | 0.85       |
| Brapa_Chiifu_v1.0 A10 3 BGIScaffold000087 - 2009-08-13       |  |  |  | <u>30</u>       | 3.4        |
| Brapa_Chiifu_v1.0 A04 7 BGIScaffold000083 - 2009-08-13       |  |  |  | <u>30</u>       | 3.4        |
| Brapa_Chiifu_v1.0 A09 20 BGIScaffold000056 - 2009-08-13      |  |  |  | <u>30</u>       | 3.4        |
| Brapa_Chiifu_v1.0 A06 11 BGIScaffold000044 + 2009-08-13      |  |  |  | <u>30</u>       | 3.4        |
| Brapa_Chiifu_v1.0 A02 11 BGIScaffold000007 + 2009-08-13      |  |  |  | <u>30</u>       | 3.4        |
| Brapa_Chiifu_v1.0 A03 1 BGIScaffold000005 + 2009-08-13       |  |  |  | <u>30</u>       | 3.4        |
| <br>>Brapa_Chiifu_v1.0 A09 13 BGIScaffold000057 - 2009-08-13 |  |  |  |                 |            |
| Length = 1431623   |  |  |  |                 |            |
| Score = 54.0 bits (27), Expect = 2e-07                       |  |  |  |                 |            |
| Identities = 30/31 (96%)                                     |  |  |  |                 |            |
| Strand = Plus / Plus   |  |  |  |                 |            |
| <br>Query: 1            atactacaatggagacattaagactaggaag 31   |  |  |  |                 |            |
|  |  |  |  |                 |            |
| Sbjct: 300867 atactacaatggagacattaagacgaggaag 300897         |  |  |  |                 |            |
| <br>Score = 54.0 bits (27), Expect = 2e-07                   |  |  |  |                 |            |
| Identities = 30/31 (96%)                                     |  |  |  |                 |            |
| Strand = Plus / Minus  |  |  |  |                 |            |
| <br>Query: 1            atactacaatggagacattaagactaggaag 31   |  |  |  |                 |            |
|  |  |  |  |                 |            |
| Sbjct: 1305088 atactacaatggagacattaagacgaggaag 1305058       |  |  |  |                 |            |

Kuva 7. Esimerkki BLAST-ohjelman tuloksesta 31 nukleotidin mittaiselle hakusekvenssille Radish Genome Database- verkkosivuston Brapa Chiifu\_v1.0 -tietokannasta. Ohjelma listaa vastaavat sekvenssit parhaimman osuvuuden mukaiseen järjestykseen tietokannasta. Tuloksissa on vastaavien sekvenssien alku-, ja loppukohdan tietokannasta. Grafiikka osoittaa rinnastuksessa nukleotidikohtaiset samankaltaisuudet sekvenssissä (bp/bp), E-arvo (E-value), bitti pisteet (bit-score,  $S'$ ) ja tietokannassa samankaltaisen sekvenssin DNA-juostesuunta (strand).

Haun alussa BLAST-ohjelma muodostaa vaihtoehtoisia sekvenssejä hakusekvenssin kaikkiin nukleotideihin asetettujen parametrien mukaisesti, jolloin kaikista hakusekvenssin nukleotideista muodostuu matriisi eli hakutaulukko. BLAST-ohjelma etsii hakutaulukon vaihtoehtoisia sekvenssejä tietokannasta. Aukottoman tai aukollisen sekvenssikohdan löydyttyä valitun matriisin laskentatavan mukaisesti etsiminen käynnistyy juosteen molempiin suuntiin. Haun loputtua ohjelma listaa tietokannasta vastaavien sekvenssien kohdat suurimmasta pienimpään E-arvon (E-value) tai vastaavan sekvenssin bitti pistemäärän (bit-score,  $S'$ ) mukaisessa järjestyksessä. E-arvo on odotusarvo, joka kuvaa sattumanvaraisesti odotettavissa olevien osumien lukumäärää. E-arvo pienenee eksponentiaalisesti pistemäärän kasvaessa. E-arvo antaa



yleensä saman lajittelujärjestyksen kuin bitti pistemäärä. Vastaavien sekvenssien tulokset ovat saatavana myös graafisena rinnastuksena (Kuva 7), jossa esitetään hakusekvenssille vastaavanlaisen sekvenssin identtisyysprosentti (identity %), vastaavuusprosentti (similarity %), aukkojen prosentuaalinen määrä (gaps %) ja vastaavan alueen suunta DNA-juosteessa. Haun kohdistuksen yleistä laatua kuvaa numeerinen piste arvo (score, S), jonka muodostumisen määrittelee pisteytysmatriisi ja aukkojen sallittu raja. Piste arvo on laskennallisesti *log*-skaalattu versio, jonka avulla käyttäjä arvioi hakutilan suuruutta. Tutkimuksissa BLAST-ohjelmaa käytetään lajien tunnistamiseen, sekvenssin sijainnin määrittämiseen ja DNA-kartoitukseen

## 4 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tämän tutkimuksen päätavoitteena oli kehittää SNP-merkkeihin perustuva työkalu, jolla tunnistettaisiin rypsin F1 hybridi risteytysjälkeläistöstä yksilöt, joilla fertiliteetin palauttava PPR-B-geenialue on integroitunut ylimääräisestä retikan kromosomista rypsin genomiin. SNP-työkalun kehittämisessä keskityttiin valitsemaan lajispesifisiä retikan ja rypsin SNP-merkkejä. Osatavoitteina oli

- 1) hakea tietokanta lajispesifisten retikan SNP-merkkien valintaan.
- 2) testata laboratoriossa SNP-työkaluun valittujen SNP-merkkien lajispesifisyys.
- 3) selvittää tässä työssä kehitetyn SNP-työkalun soveltuvuutta PPR-geenialueen integraation havaitsemiseen.

Lisäksi tutkimuksessa arvioitiin, voiko SNP-merkkejä luotettavasti valita *in silico*-mallintamalla ja voiko tässä työssä kehitettyä retikan ja rypsin SNP-merkkeihin perustuvaa SNP-työkalua hyödyntää rypsin hybridijalostusmenetelmän kehittämisessä.

## 5 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 5.1 Tietokannan haku

SNP-työkaluun keskityttiin valitsemaan retikan SNP-merkit, jotka eivät löytyisi *in silico* mallinnuksen avulla rypsin genomista vaan olisivat lajispesifisiä retikalle. Lajispesifisten retikan SNP-merkkien valintaan haettiin rypsin genomien sisältävää tietokantaa, mikä toteutettiin verkkoselaimella. Haussa hakusanoina käytettiin tutkimusaineiston koejäsenten latinankielisiä nimiä: *Raphanus sativus*, *Brassica rapa* ja englannin kielisiä hakusanoja: blast, database ja genome. Työhön valittiin neljä tutkimuspohjaista verkkosivustoa verkkoselaimen hakutuloksista (Taulukko 1). Verkkosivustojen sisältämiä tietokantoja ja sekvenssi tietolähteitä tarkasteltiin, minkä lisäksi verkkosivustojen BLASTN-ohjelman käyttöominaisuuksia verrattiin NCBI-verkkosivuston BLASTN-ohjelmaan. Vertailussa havaittiin, että NCBI-verkkosivuston BLASTN-ohjelma oli päivitetty tammikuussa 2017 ja se oli viimeksi päivitettyin BLASTN-ohjelma versio. Tämän havainnon pohjalta työssä käytettäväksi valittiin NCBI-verkkosivuston BLASTN-ohjelma ja Genbankin *B. rapa* (taxid:3711) lajin sekvenssitietokannat. Radish Genome Database- verkkosivuston sisältämä *B. rapa*\_Chiifu\_v1.0- tietokanta valittiin työhön, jolla varmistettiin lajispesifisten retikan SNP-merkkien valintaa Genbankin *B. rapa* (taxid:3711) lajin sekvenssitietokannoista.

Taulukko 1. Tutkimuspohjaiset verkkosivustot ja osoitteet.

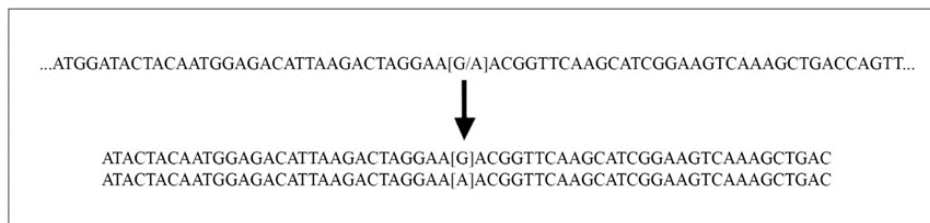
| Verkkosivuston nimi              | Verkko-osoite   |
|----------------------------------|---|
| Radish Genome Database           | <a href="http://radish-genome.org/">http://radish-genome.org/</a>   |
| NODAI Radish Genome Database     | <a href="http://www.nodai-genome-d.org/">http://www.nodai-genome-d.org/</a>   |
| Raphanus Sativus Genome Database | <a href="http://radish.kazusa.or.jp/">http://radish.kazusa.or.jp/</a>   |
| RadishBase                       | <a href="http://bioinfo.bti.comell.edu/cgi-bin/radish/index.cgi">http://bioinfo.bti.comell.edu/cgi-bin/radish/index.cgi</a> |

Aiemmin hankkeessa PPR-geenialueet sisältävän retikan BAC64 kloonin sijainti oli kohdennettu retikan R9-kromosomiin. Tässä työssä retikan tietokannoista kartoitettiin PPR-geenialueiden sijaintia retikan kromosomistossa retikan BAC64 kloonin avulla. Retikan BAC64 kloonin 127479bp sekvenssille tehtiin tietokantahaku retikan genomiin. Sekvenssivertailussa käytettiin NCBI, Radish Genome Database, NODAI Radish Genome Database, Raphanus Sativus Genome Database ja RadishBase- verkkosivustojen sisältämiä retikan tietokantoja. Jokaisen retikan tietokannan haun ensimmäistä tulosta verrattiin keskenään ja suurin vastaavuusalue BAC64 kloonille havaittiin Radish Genome Database-verkkosivuston Radish\_V124.fix.fa- tietokannan R9-kromosomi alueelta.

## 5.2 Tietokantahaku BLASTN-ohjelmalla

*In silico* -mallinnuksessa käytettiin Mun ym. (2015) tutkimuksen 118 retikan R9-kromosomin SNP-merkkiä, joista *in silico* -mallinnuksella SNP-työkaluun valittujen retikan SNP-merkkien lajispesifisyys testattaisiin laboratoriossa Fluidigm-analyysilla. Retikan SNP-merkkien 201 bp mittaiset sekvenssit haettiin erikseen molemmilla alleeleilla *B. rapa* lajin tietokannoista NCBI-verkkosivuston BLASTN-ohjelmalla (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Haussa käytettiin 'megablast' -optimointia. Retikan SNP-merkit, joille ei löytynyt referenssisekvenssiä *B. rapa* lajin tietokannoista, ne lyhennettiin 61bp pituuteen tarkentamaan merkkien uudelleen hakua (Kuva 8). Retikan SNP merkit haettiin uudelleen erikseen molemmilla alleeleilla *B. rapa*\_Chiifu\_v1.0 -tietokannasta Radish Genome Database- verkkosivuston BLASTN-ohjelmalla (<http://radish-genome.org>). Haussa käytettiin 'similar sequence' -optimointia, lisäksi E-arvo oli rajattu 1e-10:een ja matriisiksi oli valittu BLOSUM62. *In silico*-mallinnukselle kontrollitoimena oli laboratoriossa retikkanäytteeseen testattujen 47 rypsin SNP-merkin sekvenssivertailu retikan genomiin. Kontrollitoimessa käytettiin Radish\_V124.fix.fa-tietokantaa ja Radish Genome Database-verkkosivuston BLASTN-ohjelmaa (<http://radish-genome.org/>). Rypsin SNP-merkit lyhennettiin 61bp pituuteen

ja sekvenssit haettiin erikseen molemmilla alleleilla. Haussa käytettiin 'similar sequence' -optimointia, lisäksi E-arvo oli rajattu 1e-10:een ja matriisiksi oli valittu BLOSUM62.



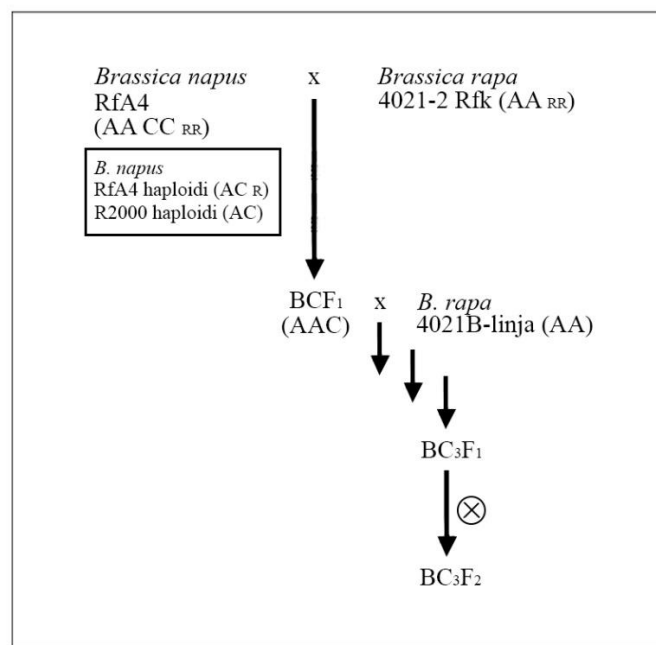
Kuva 8. Tarvittaessa SNP-merkin molemmat alleelit lyhennettiin kuvan osoittamalla tavalla tarkentamaan merkin referenssisekvenssin hakua BLAST-ohjelmalla.

### 5.3 SNP-työkalun testaaminen

#### 5.3.1 Koejäsenet

SNP-työkalun testauksen koejäsenet koostuivat retikan SNP-merkkien positiivi ja negatiivi kontrolleista sekä rypsin risteytysjälkeläistön aineistotestauksesta (Taulukko 2). SNP-työkalun aineistotestauksessa käytettiin rypsin takaisinristeytysohjelman 22 jälkeläisen otosta, jossa jälkeläiset olivat BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> sukupolvea (Kuva9). SNP-työkalun testauksessa viisi koejäsentä oli retikan SNP-merkkien positiivi kontrolleja. Retikan SNP-merkkien positiivi kontrollina toimi retikan tavanomainen lajike 'Daikon'(Japani) ja sen useamman yksilön lehdistä kerätty bulk-näyte. Retikan SNP-merkkien positiivi kontrollina toimi myös retikan kromosomin sisältävä rypsin palauttajalinja eli R-linja 4021-2 Rfk (Helsingin yliopisto), jonka ylimääräisessä kromosomissa on PPR-B-geenialue. Tulevaisuudessa SNP-työkalua voitaisiin hyödyntää myös hankkeen muihin rypsin takaisinristeytysohjelmiin, joissa on käytetty kromosomiltaan yksinkertaista eli haploidista rapsilinja RfA4:sta tai haploidista rapsilinja R2000:tta toisena vanhempana. Tästä syystä rypsin jalostuslinjat RfA4

ja R2000 sisällytettiin koejäseniin. SNP-työkalussa rapsin jalostuslinja RfA4 (Plantech Research Institute, Japani) toimi retikan SNP-merkkien positiivi kontrollina, mikä sisältää todennäköisesti PPR-B-geenialueen 4021-2 Rfk:n tavoin ylimääräisessä retikan kromosomissa tai kromosomin osassa. Rapsin jalostuslinja R2000 (Institut national de la recherche agronomique, Ranska) toimi retikan SNP-merkkien positiivi kontrollina, minkä C genomin kromosomissa on integroituneena *Rfk*-geenille homologinen *Rfo*-geeni.



Kuva 9. Tässä tutkimuksessa tarkasteltiin rapsi (*B. napus*) x rypsi (*B. rapa*) takaisinristeytysohjelman jälkeläisiä BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> sukupolvessa. Kuvassa esiintyvä pieni RR kuvaa rypsin ja rapsin perimässä sijaitsevaa ylimääräistä retikan kromosomia tai kromosomin osaa. Kuvassa näkyvät kehystettynä kaksi rapsin haploidista risteytysvanhempaa, RfA4 ja R2000, joiden risteytysjälkeläistön testauksessa voidaan hyödyntää samaa SNP-työkalua.

SNP-työkalun testauksessa neljä koejäsentä oli retikan SNP-merkkien negatiivi kontrolleja. Retikan SNP-merkkien negatiivi kontrollina toimi takaisinristeytysohjelmassa isälinjan lähtöaineistona käytetty rypsin jalostuslinja 4021B (AA-genomi) (Niemelä 2013) ja rypsin tavanomaiset viljelyssä olevat

lajikkeet 'Cordelia' ja 'SW Petita'. SNP-työkalussa retikan SNP-merkkien negatiivi kontrollina toimi myös rypsi 58.Cordelia 1. (Boreal kasvinjalostus Oy), joka sisältää osia rapsin PPR-geenialueesta. SNP-työkalussa jokaisesta kontrollista testattiin 8 yksilön lehtinäytteet, paitsi retikan 'Daikon' bulk-näytteestä testattiin kaksi näytettä. Lehtinäytteiden kasvatus ja keruu suoritettiin Helsingin yliopiston Viikin tutkimus kasvihuoneella ja osaksi Boreal Kasvinjalostus Oy:n kasvihuoneilla.

Taulukko 2. SNP-työkalun testaamisessa käytettyjen koejäsenten nimet, kasvilajit, näytteenotto-vuosi, työssä koejäsenille annetut koodit sekä koejäsenen asema kontrollina retikan SNP-merkeille.

| Koodi          | Koejäsen   | Kasvilaji                        | Näytteenotto-vuosi | Kontrolli |
|----------------|--|----------------------------------|--------------------|-----------|
| Daikon         | Retikka 'Daikon'                                 | <i>R. sativus</i>                | 2017               | positiivi |
| BULK-Daikon    | Retikka 'Daikon'                                 | <i>R. sativus</i>                | 2015               | positiivi |
| 4021-2 Rfk     | Kevätrypsi 4021-2 Rfk                            | <i>B. rapa</i>                   | 2017               | positiivi |
| RfA4           | Kevätrypsi RfA4                                  | <i>B. napus</i>                  | 2017               | positiivi |
| R2000          | Syysrapsi R2000                                  | <i>B. napus</i>                  | 2017               | positiivi |
| 4021B          | Kevätrypsi 4021B                                 | <i>B. rapa</i>                   | 2017               | negatiivi |
| 58.Cordelia 1. | Kevätrypsi 58.Cordelia 1.                        | <i>B. rapa</i>                   | 2017               | negatiivi |
| SW Petita      | Kevätrypsi 'Petita'                              | <i>B. rapa</i>                   | 2017               | negatiivi |
| Cordelia       | Kevätrypsi 'Cordelia'                            | <i>B. rapa</i>                   | 2017               | negatiivi |
| BC3F2          | RY x RA BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> yksilöitä | <i>B. rapa</i> x <i>B. napus</i> | 2017               | *         |

\* retikan SNP-merkkien monistumista tarkastellaan työkalulla

### 5.3.2 DNA eristys

Lehtinäytteiden koko genomisen DNA pikaeristettiin TissueLyser Adapter setillä (QIAGENR). Rypsin jalostuslinja 4021B ja retikan tavanomainen lajike 'Daikon' yhden yksilön lehtinäytteestä jaettiin kaksi rinnakkaisnäytettä, jotka eristettiin DNA pikaeristämällä ja CTAB menetelmällä (Doyle & Doyle, 1987). Rinnakkaisnäytteiden eri DNA eristysmenetelmien toimivuutta verrattiin Fluidigim analyysin tuloksista. Jokaisesta pikaeristettävästä lehtinäytteestä sijoitettiin noin 5mm pala eristysputkeen, johon sekoitettiin 80 µl 0,25M NaOH ja lisättiin halkaisijaltaan 3mm kuula. Putkia ravisteltiin 2min

kolme kertaa 18Hz, (TissueLyser II, QIAGENR), jonka jälkeen näytteet sentrifugattiin alas putkissa 1000 rpm (Eppendorf 5804 D, Eppendorf AG, Saksa). Näytteet inkuboitiin 94°C 1min 20s. ja sentrifugattiin 3300 rpm 20s. Lopuksi putkiin lisättiin 120µl 0,5 M Tris-HCl (pH 8) 0,25% Nonidet P40-liuosta, jonka jälkeen inkuboitiin 94°C 2min 30s. ja sentrifugattiin 3300 rpm 10s. Eristettyä DNA:ta käytettiin noin 40µl Fluidigm analyysiin.

### 5.3.3 Fluidigm

*In silico*- menetelmällä SNP-työkaluun valituille retikan R9-kromosomin SNP-merkeille Fluidigm Corporation suunnitteli STA, ASP1, ASP2 ja LSP-alukkeet. Aiemmin hankkeessa rypsin kromosomiston 96 SNP-merkin kokoelman monistuminen oli testattu retikkanäytteessä Fluidigm analyysillä. Tässä työssä Fluidigm SNP Genotyping Analysis -ohjelmalla tarkasteltiin kokoelman merkkien monistumista retikkanäytteessä ja SNP-merkin teknistä toimivuutta. SNP-työkalussa rypsin SNP-merkkien avulla tulisi havaita aineistosta kaikki rypsin kromosomit. Kokoelmasta valittiin 60 rypsin SNP-merkkiä (Tanhuanpää ym. 2015, Boreal kasvinjalostus Oy) SNP-työkalun testaukseen, mitkä kattoivat rypsin kaikki kromosomit. Lisäksi kokoelman ulkopuolelta SNP-työkalun testaukseen lisättiin kaksi retikkanäytteessä testaamatonta rypsin A9-kromosomin SNP-merkkiä (Boreal kasvinjalostus Oy). SNP-työkalun testauksessa käytettiin retikan ja rypsin SNP-merkkejä yhteensä 95 ja lisäksi SNP-työkaluun lisättiin retikan R9-kromosomiin kohdennettu *B. rapa* ssp. *pekinensis* BAC-klooni KBrB025K04 BAC-SNP-merkki (RsH016N04) (Mun ym. 2015).

Fluidigm analyysissa käytettiin 96 näytepaikkaista ajolevykettä (The Fluidigm 96.96 Dynamic Array™). Ajolevykkeen näytepuolen 92 näytepaikkaa täytettiin koejäsenten näytteillä ja neljä näytepaikkaa olivat analyysin ei templaattisia kontrolleja (Liite 4). Ajolevykkeen alukepuoli täytettiin retikan ja rypsin SNP-merkkien alukkeilla (Liite 2). Reagenssimäärien lisääminen ja

analyysin eri työvaiheet suoritettiin Fluidigm SNP genotyping user guide ([https://www.fluidigm.com/binaries/content/assets/fluidigm/snpgt\\_analysis\\_ug\\_68000098.pdf](https://www.fluidigm.com/binaries/content/assets/fluidigm/snpgt_analysis_ug_68000098.pdf)) SNP Type™ Assays for SNP Genotyping on the Dynamic Array™ IFCs -osion ohjeiden mukaisesti. Fluidigm analyysin tuloksia tarkasteltiin Fluidigm SNP Genotyping Analysis -ohjelmalla.

## 6 TULOKSET

Menetelmä osiossa esitettiin osa tuloksista, jotka vaikuttivat työn toteuttamiseen. Tulokset osiossa on esitettyä tietokantojen tarkastelun tulokset ja SNP-työkalun testauksen tulokset.

### 6.1 DNA tietokantojen käyttö

#### 6.1.1 Tietokannan valinta

Lajispesifisten retikan SNP-merkkien valintaan *in silico*-mallinnuksen avulla tarvittiin rypsin genomien sisältävä tietokanta, mihin työssä valittiin Genbankin *B. rapa* lajin tietokannat ja B. rapa\_Chiifu\_v1.0- tietokanta. Työssä tarkasteltiin Radish Genome Database, NODAI Radish Genome Database, Raphanus Sativus Genome Database ja RadishBase verkkosivustoja, jotka sisälsivät kasvilajien tietokantoja eri sekvenssi tietolähteistä (Taulukko 3). Radish Genome Database verkkosivusto sisälsi neljän kasvilajin tietokannat, joista *B. oleracea* sekä *Arabidopsis thaliana* lajien tietokantoja ei tässä työssä tarkasteltu. NODAI Radish Genome Database verkkosivusto sisälsi yhden *R. sativus* genomisekvenssiin pohjautuvan tietokannan, jota oli laajennettu liittä-mällä markkerien ja geenimallien sekvenssejä. Raphanus Sativus Genome Database verkkosivusto sisälsi myös yhden *R. sativus* genomisekvenssiin pohjautuvan tietokannan. RadishBase-verkkosivusto sisälsi yhden *R. sativus* lajin tietokannan, joka pohjautui retikoiden EST-markkerien ja mitokondrioiden sekvensseihin.



Verkkosivustojen BLASTN-ohjelman käyttöominaisuudet olivat keskenään samanlaiset ja niissä käytettävissä oli 'similar blast'-optimointi. NCBI-verkkosivuston BLASTN-ohjelma sisälsi 'mega blast', 'discontiguous megablast' ja 'similar blast'-optimoinnit. NCBI-verkkosivustolla oli päivitetyn 2.6.0. ohjelmaversio ja muiden verkkosivustojen ohjelmaversiot olivat aikaisempia ohjelmaversioita.

### Taulukko 3. Verkkosivustojen tietokantojen nimet, kasvilajit, tietokannan data tyyppi, BLASTN ohjelmaversio ja verkkosivustojen osoitteet

| Verkkosivuston nimi              | Tietokannan nimi  | Kasvilajit   | Data tyyppi   | BLASTN ohjelmaversio | Verkkosivuston osoite   |
|----------------------------------|---|--|---|----------------------|---|
| Radish Genome Database           | Radish_V124.fix.fa <sup>1</sup><br>B. rapa_Chiifu_v1.0 <sup>2</sup><br>-<br>- | Raphanus sativus<br>Brassica rapa<br>Brassica oleracea<br>Arabidopsis thaliana | Genomisekvenssit ja vertailevat Brassica genomit, muut Brassicaceae-genomit | 2.2.26               | <a href="http://radish-genome.org/">http://radish-genome.org/</a>   |
| NODAI Radish Genome Database     | rsg_allv1 <sup>3</sup>  | Raphanus sativus   | Genomisekvenssit ja markkerit, geenimallit                                  | 2.2.25               | <a href="http://www.nodai-genome-d.org/">http://www.nodai-genome-d.org/</a>   |
| Raphanus Sativus Genome Database | RSA_r1.0 <sup>4</sup>   | Raphanus sativus   | Genomisekvenssit  | 2.2.18               | <a href="http://radish.kazusa.or.jp/">http://radish.kazusa.or.jp/</a>   |
| RadishBase                       | radish_unigene <sup>5</sup>   | Raphanus sativus   | Raphanus-sekvenssien EST-markkerien sekvenssit, mitokondrioiden sekvenssit  | 2.2.16               | <a href="http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/radish/index.cgi">http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/radish/index.cgi</a> |

-tietokannan nimi ei tiedossa

<sup>1</sup> Mun, J. H., Chung, H., Chung, W. H., Oh, M., Jeong, Y. M., Kim, N., Ahn, B. O., Park, B. S., Park, S., Lim, K. B., Hwang, Y. J. & Yu, H. J. 2015.

Construction of a reference genetic map of *Raphanus sativus* based on genotyping by whole-genome resequencing. Theoretical and Applied Genetics 128:259–272.

<sup>2</sup> Wang, X., Wang, H., Wang, J., Sun, R., Wu, J., Liu, S., Bai, Y., Mun, J. H., Bancroft, I., Cheng, F., Huang, S., Li, X., Hua, W., Wang, J., Wang, X., Freeling, M., Pires, J. C., Paterson, A. H., Chalhoub, B., Wang, B., Hayward, A., Sharpe, A. G., Park, B. S., Weisshaar, B., Liu, B., Li, B., Liu, B., Tong, C., Song, C., Duran, C., Peng, C., Geng, C., Koh, C., Lin, C., Edwards, D., Mu, D., Shen, D., Soumpourou, E., Li, F., Fraser, F., Conant, G., Lassalle, G., King, G. J., Bonnema, G., Tang, H., Wang, H., Belcram, H., Zhou, H., Hirakawa, H., Abe, H., Guo, H., Wang, H., Jin, H., Parkin, I. A., Batley, J., Kim, J. S., Just, J., Li, J., Xu, J., Deng, J., Kim, J. A., Li, J., Yu, J., Meng, J., Wang, J., Min, J., Poulain, J., Wang, J., Hatakeyama, K., Wu, K., Wang, L., Fang, L., Trick, M., Links, M. G., Zhao, M., Jin, M., Ramchiary, N., Drou, N., Berkman, P. J., Cai, Q., Huang, Q., Li, R., Tabata, S., Cheng, S., Zhang, S., Zhang, S., Huang, S., Sato, S., Sun, S., Kwon, S. J., Choi, S. R., Lee, T. H., Fan, W., Zhao, X., Tan, X., Xu, X., Wang, Y., Qiu, Y., Yin, Y., Li, Y., Du, Y., Liao, Y., Lim, Y., Narusaka, Y., Wang, Y., Wang, Z., Li, Z., Wang, Z., Xiong, Z. & Zhang, Z. 2011. *Brassica rapa* Genome Sequencing Project Consortium The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. Nature Genetics 43: 1035-1039.

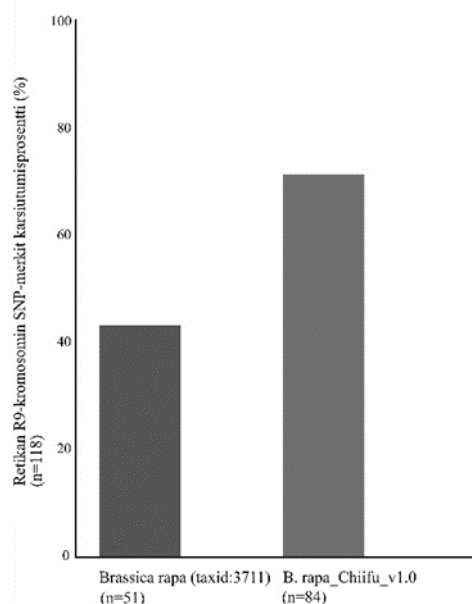
<sup>3</sup> Mitsui, Y., Shimomura, M., Komatsu, K., Namiki, N., Shibata-Hatta, M., Imai, M., Katayose, Y., Yoshiyuki Mukai, Y., Kanamori, H., Kurita, K., Kagami, T., Wakatsuki, A., Ohyanagi, H., Ikawa, H., Minaka, N., Nakagawa, K., Shiwa, Y. & Sasaki, T. 2015. The radish genome and comprehensive gene expression profile of tuberous root formation and development. Scientific Reports 5:10835.

<sup>4</sup> Shirasawa, K., Oyama, M., Hirakawa, H., Sato, S., Tabata, S., Fujioka, T., Kimizuka-Takagi, C., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kato, M., Kishida, Y., Kohara, M., Takahashi, C., Tsuruoka, H., Wada, T., Sakai, T. & Isobe, S. 2011. An EST-SSR linkage map of *Raphanus sativus* and comparative genomics of the Brassicaceae. DNA Research 18: 221-232.

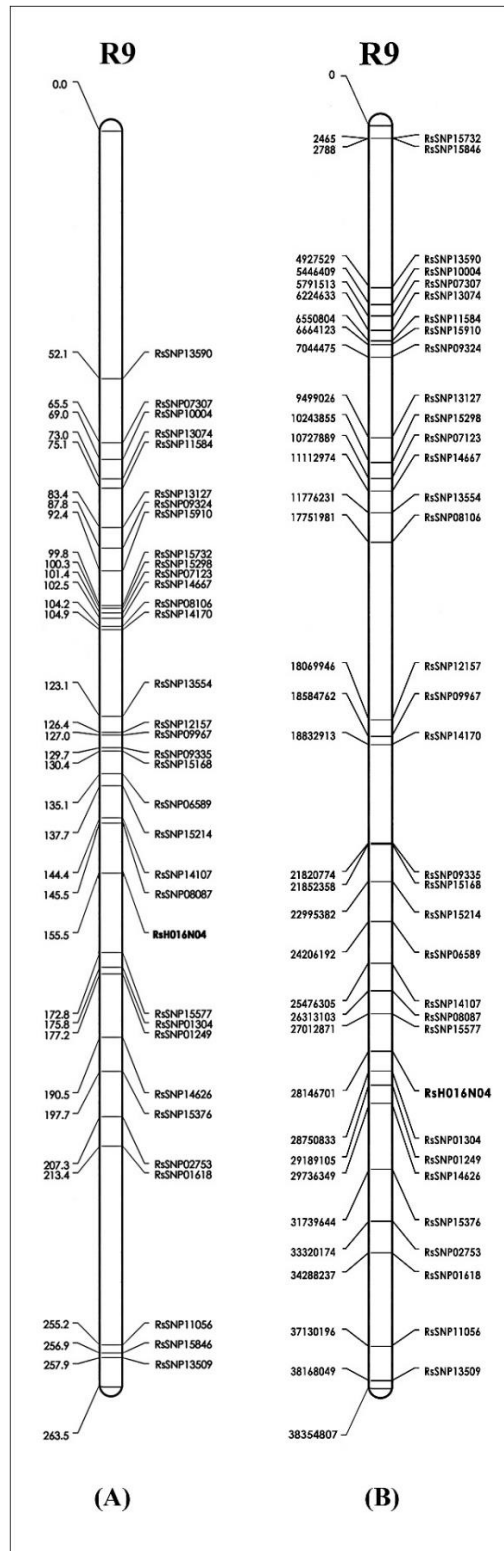
<sup>5</sup> Shen, D., Sun, H., Huang, M., Zheng, Y., Li, X. & Fei, Z. 2013. RadishBase: A Database for Genomics and Genetics of Radish. Plant Cell Physiology 54:2.

### 6.1.2 Tietokantahaku BLAST-ohjelmalla

Retikan R9-kromosomin 118 SNP-merkin sekvenssiverrailu tehtiin Genbankin *B. rapa* lajin sekvenssitietokantoihin ja Radish Genome Database- verkkosivuston *B. rapa*\_Chiifu\_v1.0 -tietokantaan. (Kuva 10). Retikan R9-kromosomin SNP-merkeistä 43%:a ei ollut retikalle lajispesifisiä sekvenssiverrattessa Genbankin *B. rapa* lajin sekvenssitietokantoihin (10.08.2017). *B. rapa*\_Chiifu\_v1.0 -tietokannasta 71%:lle löytyi vastaavuus toisella tai molemmilla alleeleilla (10.08.2017). Laboratoriossa tehtävään lajispesifisyys testaukseen valittiin 33 retikan R9-kromosomin SNP-merkkiä, jotka esiintyivät 205,8 cM karttaetäisyys alueella keskimäärin 6,4 cM välein mukaan lukien lisätty BAC-SNP merkki (Kuva 11 A). Lajispesifisyys testaukseen valitut retikan SNP-merkit sijaitsivat koko R9-kromosomin alueella (Kuva 11 B).



Kuva 10. Työssä sekvenssiverrattiin retikan R9-kromosomin 118 SNP-merkkiä Genbankin *B. rapa* lajin sekvenssitietokantoihin ja Radish Genome Database- verkkosivuston *B. rapa*\_Chiifu\_v1.0 -tietokantaan. Retikan SNP-merkeistä 43% löytyi vastaavuus *B. rapa* lajin sekvenssitietokannoista sekä 71% *B. rapa*\_Chiifu\_v1.0 -tietokannasta.



Kuva 11. *In silico*-mallinnuksella SNP-työkaluun valitut R9-kromosomin SNP-merkkien sijainnit R9-kromosomissa (Mun ym. 2015). (A) Geneettinen kartta. Kartta-etäisyydet ovat ilmoitettu senttimorganeina (cM), jotka ovat merkittynä vasemmalla puolella ja SNP-merkkien nimet ovat oikealla. (B) Fysikaalinen kartta. Karttaetäisyydet ovat ilmoitettu emäksinä (bp) kuvan vasemmalla puolella ja SNP-merkkien nimet ovat oikealla.

*In silico*-mallinnuksen kontrollitoimessa retikan genomien sisältävään tietokantaan sekvenssiverrattiin 47 rypsin SNP-merkkiä, joista retikkanäytteessä 41 rypsin SNP-merkkiä ei ollut monistunut ja 6 rypsin SNP-merkkiä oli monistunut. Retikkanäytteissä ei monistuneista rypsin SNP-merkeistä 23,4%:lle löytyi vastaavuus toisella tai molemmilla alleeleilla Radish\_V124.fix.fa-tietokannasta (19.09.2017). Retikkanäytteessä monistuneille Bra026898\_1237, Bra036047\_559 ja Bra024749 ei löytynyt vastaavuutta Radish\_V124.fix.fa-tietokannasta (19.09.2017).

Retikan BAC64 kloonin 127479bp sekvenssille parhaimman samankaltaisen sekvenssin bitti pisteen (bits) tuloksen antoi Radish Genome Database-verkkosivuston Radish\_V124.fix.fa-tietokanta (Taulukko 4). BAC64 kloonille vastaavan alueen Radish\_V124.fix.fa-tietokanta osoitti R9-kromosomissa (12.6.2017). NODAI Radish Genome Database- verkkosivuston rsg\_allv1-tietokanta osoitti BAC64 kloonille vastaavan alueen Rsa1.0\_01467.1 alueella (12.6.2017). Raphanus Sativus Genome Database-verkkosivuston RSA\_r1.0-tietokanta osoitti vastaavan alueen Rs\_scaf131 alueella (12.6.2017) ja RadishBase-verkkosivuston radish\_unigene-tietokanta osoitti vastaavan alueen UN05282 alueella (12.6.2017). NCBI-verkkosivuston BLASTN-ohjelman tulos oli kokomittainen retikan BAC64 kloonin sekvenssi (12.6.2017) eikä BAC64 kloonille vastaavaa aluetta voitu paikantaa retikan genomista NCBI:n BLASTN-ohjelmalla. Hankkeessa aiemmin retikan BAC64 kloonin sijainti oli kohdennettu R9-kromosomiin ja tässä työssä myös parhaimman hakutuloksen retikan BAC64 kloonille saatiin R9-kromosomista.

Taulukko 4. Tietokantahaku tulokset retikan BAC64 kloonin 127479bp sekvenssille.

| Verkkosivuston nimi              | Tietokannan nimi   | Tietokannan alue | Tietokannan alueen koko (bp) | Haun osuma (bits) | Alueen vastaavuus (bp/bp) |
|----------------------------------|--------------------|------------------|------------------------------|-------------------|---------------------------|
| Radish Genome Database           | Radish_V124.fix.fa | R9               | 38354807                     | 5546              | 5608/5637                 |
| NODAI Radish Genome Database     | rsg_allv1          | Rsa1.0_01467.1   | 45161                        | 5462              | 5561/5609                 |
| Raphanus Sativus Genome Database | RSA_r1.0           | Rs_scaf131       | 372218                       | 5462              | 5606/5609                 |
| RadishBase                       | radish_unigene     | UN05282          | 994                          | 852               | 959/994                   |

## 6.2 SNP-työkalun testaaminen

### 6.2.1 Rypsin SNP-merkkien valinta

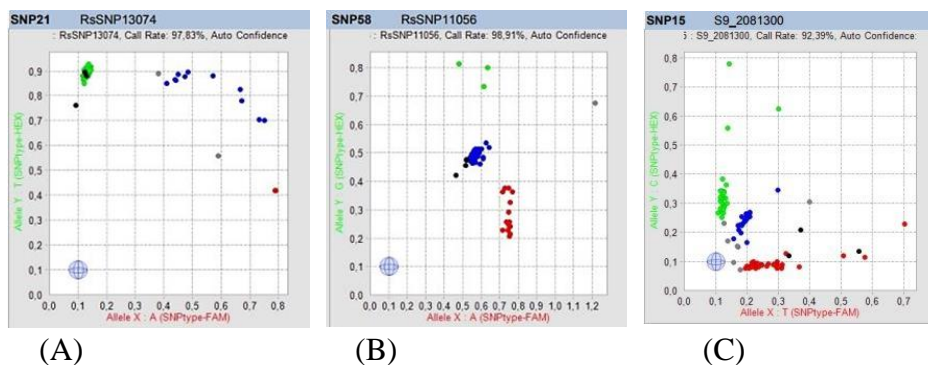
Aiemmin hankkeessa tehdyn Fluidigm analyysin tuloksista tarkasteltiin rypsin kromosomiston 96 SNP-merkki kokoelman monistumista retikkanäytteessä ja SNP-merkkien vesipisteiden sijainteja. Retikkanäytteessä rypsin SNP-merkkejä monistui 43,75%:a sekä vesipiste oli kartalla rypsin SNP-merkeistä 13,54%:lla (Liite 3). Tarkastelussa rypsin SNP-merkeistä 37,5% hylättiin SNP-työkalusta. Kokoelmasta SNP-työkalun testaukseen valittiin 50 retikkanäytteessä ei monistunutta rypsin SNP-merkkiä ja 10 rypsin SNP-merkkiä, jotka olivat monistuneet retikkanäytteessä. SNP-työkalun testauksessa käytettiin 62 rypsimerkkiä rypsin eri kromosomeista (Taulukko 5). A9-kromosomin S9\_8224170 ja S9\_32116439 monistumista retikkanäytteessä ei tiedetty ennalta.

Taulukko 5. SNP-työkalun testaamiseen valittujen rypsin SNP-merkkien määrällinen jakautuminen rypsin kromosomeihin.

| Rypsin<br>kromosomi | SNP-merkki<br>määrä (kpl) |
|---------------------|---------------------------|
| A1                  | 6                         |
| A2                  | 3                         |
| A3                  | 6                         |
| A4                  | 5                         |
| A5                  | 5                         |
| A6                  | 9                         |
| A7                  | 6                         |
| A8                  | 4                         |
| A9                  | 14                        |
| A10                 | 4                         |

### 6.2.2 Kontrollit

SNP-työkalun 33 retikan SNP-merkin ja BAC-SNP-merkin sekä 62 rypsin SNP-merkin teknistä toimivuutta tarkasteltiin Fluidigm analyysin tuloksista. NTC sijainti ei ollut optimaalinen kahdessa retikan SNP-merkissä (RsSNP13074, RsSNP11056) sekä yhdessä rypsin SNP-merkissä (S9\_2081300), joiden antama tulos oli tulkittavissa huonosti eikä SNP-merkkejä käytetty tulosten analysoinnissa (Kuva 12). Retikan tavanomainen lajike 'Daikon' rinnakkaisnäytteiden tulokset olivat tulkittavissa huonosti eikä rinnakkaisnäytteiden eri eristysmenetelmien toimivuutta verrattu toisiinsa. Myös rypsin jalostuslinja 4021B rinnakkaisnäytteiden tulokset olivat tulkittavissa huonosti eikä niitä verrattu toisiinsa.



Kuva 12. Kartalla sijaitsevat värilliset pisteet havainnoivat SNP-merkin monistumista koejäsenissä ja mustat pisteet ovat ei templaattisia kontrolleja. Tulos oli huonosti tulkittavissa SNP-työkalun retikan SNP-merkeistä (A) RsSNP13074 (SNP21) ja (B) RsSNP11056 (SNP58) sekä rypsin SNP-merkeistä (C) S9\_2081300 (SNP15).

31 retikan SNP-merkkiä oli tulkittavissa hyvin ja merkkien monistumista havaittiin kontrolleilla (Taulukko 6). SNP-työkalussa positiivi kontrollina toimivat retikan tavanomainen lajike 'Daikon' ja useamman yksilön lehdistä kerätty 'Daikon' bulk-näyte, sekä retikan ylimääräisen tai integroituneen kromosomin sisältävät rapsin jalostuslinjat R2000 ja RfA4 sekä rypsin R-linja 4021-2 Rfk. Jokaisessa retikan tavanomainen lajike 'Daikon' yksilönäytteessä ja yhdessä 'Daikon' bulk-näytteessä monistui kaikki 31 retikan SNP-merkkiä, mutta toisessa 'Daikon' bulk-näytteessä ei monistunut RsSNP06589-merkki. Rapsin jalostuslinja RfA4:n kaikissa yksilönäytteissä monistui 5 retikan SNP-merkkiä. Rypsin R-linjan 4021-2 Rfk kuuden yksilön näytteessä monistui samat viisi retikan SNP-merkkiä. Lisäksi yhdellä 4021-2 Rfk linjan yksilöllä havaittiin 15 ylimääräisen retikan SNP-merkin monistuminen ja toisella yksilöllä havaittiin yhden ylimääräisen retikan SNP-merkin monistuminen. Rapsin jalostuslinjan R2000 seitsemän yksilön näytteessä monistui 10 retikan SNP-merkkiä ja R2000 linjan yhdellä yksilöllä havaittiin 10 retikan SNP-merkin lisäksi RsSNP10004-merkin monistuminen. SNP-työkalun kaikissa kontrolleissa monistui BAC-SNP-merkki (RsH016N04). SNP-työkalussa negatiivi kontrollina toimivat rypsi jalostuslinja 4021B, rypsi 58.Cordelia I. sekä rypsin tavanomaiset lajikkeet 'Cordelia' ja 'SW Petita'. Negatiivi kontrolleissa havaittiin RsSNP13127, RsSNP01618, RsSNP07307-merkkien



monistumista, mitkä olivat epäinformatiivisia selvittämään retikan kromosomin siirtymistä rypsilille.

SNP-työkalun 61 rypsin SNP-merkkiä oli hyvin tulkittavissa ja niiden monistumista havaittiin kontrolleilla (Taulukko 7). Retikan tavanomainen lajike 'Daikon' ja 'Daikon' bulk-näytteen yksilönäytteissä monistui 9 rypsin SNP-merkkiä, joista aiemmin retikkanäytteessä ei ollut monistunut Bra010747\_186 ja S8\_21433770 -merkki. Nämä rypsin SNP-merkit löytyivät toisella alleelilla retikan genomista. Jokaisessa rypsin R-linja 4021-2 Rfk yksilönäytteessä monistuivat kaikki 61 rypsin SNP-merkkiä. Rapsin jalostuslinjassa RfA4 ei monistunut S6\_7320502-merkki. Rapsin jalostuslinja R2000 yksilönäytteissä ei monistunut kolme rypsin SNP-merkkiä. Jokaisessa rypsi jalostuslinja 4021B yksilönäytteessä monistuivat kaikki 61 rypsin SNP-merkkiä. Rypsi 58.Cordelia kuuden yksilön näytteissä monistuivat kaikki 31 retikan SNP-merkkiä, mutta kahdella rypsi 58.Cordelia yksilöllä ei monistunut S5\_17417256-merkki. Rypsin tavanomainen lajike 'Cordelia' kahdella yksilöllä ei monistunut sama S5\_17417256 -merkki. Rypsin tavanomainen lajike 'SW Petita' viiden yksilön näytteissä monistuivat kaikki 31 retikan SNP-merkkiä, mutta kahdella rypsi 58.Cordelia yksilöllä ei monistunut Bra036921\_710 ja Bra003121\_282-merkit. Lisäksi yhdellä rypsi 58.Cordelia yksilöllä ei monistunut Bra001747\_921-merkki sekä yhdellä rypsi 58.Cordelia yksilöllä ei monistunut S5\_17417256.

Taulukko 6. SNP-työkalun kontrollien tulokset yhdelle BAC-SNP-merkille (RsH016N04) ja 31 retikan SNP-merkille. SNP-merkit on järjestetty retikan R9-kromosomin geneettisen karttajärjestyksen mukaisesti tutkimuksessa annetuilla koodeilla.

| Koejäsenen     |                                | Retikan SNP-merkki koodi |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----------------|--------------------------------|--------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| koodi          | Yksilönäyte                    | 69                       | 91 | 22 | 70 | 33 | 44 | 84 | 24 | 83 | 79 | 94 | 32 | 93 | 57 | 9 | 80 | 68 | 11 | 67 | 47 | 81 | 20 | 88 | 12 | 18 | 77 | 82 | 95 | 55 | 66 | 72 | 45 |
| Daikon         | 2.-6.                          | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| BULK-Daikon    | 1.                             | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
|                | 2.                             | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 4021-2 Rfk     | 2., 3., 5., 6., 7., 8.         | -                        | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                | 1.                             | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | - | +  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | -  | +  | +  | -  |
|                | 4.                             | -                        | -  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                | 1., 3., 4., 5., 6., 7., 8.     | -                        | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| RfA4           | 2.                             | -                        | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
|                | 1., 2., 3., 5., 6., 7., 8.     | -                        | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | - | -  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| R2000          | 4.                             | -                        | -  | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | - | -  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                | 1., 2., 3., 4., 6., 7., 8.     | -                        | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 4021B          | 5.                             | -                        | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  |
|                | 1., 2., 4., 5., 6., 7., 8.     | -                        | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 58.Cordelia 1. | 3.                             | -                        | +  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                | 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. | -                        | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| Cordelia       | 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| SW Petita      | 1., 3., 5., 7., 8.             | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                | 2.                             | -                        | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                | 4.                             | -                        | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |

69 RsSNP13590, 91 RsSNP07307, 22 RsSNP10004, 70 RsSNP11584, 33 RsSNP13127, 44 RsSNP09324, 84 RsSNP15910, 24 RsSNP15732, 83 RsSNP15298, 79 RsSNP07123, 94 RsSNP14667, 32 RsSNP08106, 93 RsSNP14170, 57 RsSNP13554, 9 RsSNP12157, 80 RsSNP09967, 68 RsSNP09335, 11 RsSNP15168, 67 RsSNP06589, 47 RsSNP15214, 81 RsSNP14107, 20 RsSNP08087, 88 RsH016N04, 12 RsSNP15577, 18 RsSNP01304, 77 RsSNP01249, 82 RsSNP14626, 95 RsSNP15376, 55 RsSNP02753, 66 RsSNP01618, 72 RsSNP15846, 45 RsSNP13509

- ei monistuu, + monistuu

Taulukko 7. SNP-työkalun kontrollien tulokset 61 rypsin SNP-merkille. SNP-merkit on järjestetty rypsin kromosomiston fysikaalisten sijaintien mukaisesti tutkimuksessa annetuilla koodeilla.

| Koejäsenen<br>koodi |  | A01                     |  |  |  |  |  | A02 |  |  | A03 |  |  |  |  |  | A04 |  |  |  |  | A05 |  |  |  |  | A06 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|---------------------|--|-------------------------|--|--|--|--|--|-----|--|--|-----|--|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|                     |  | Rypsin SNP-merkki koodi |  |  |  |  |  |     |  |  |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

26 Bra011803\_290, 50 Bra013533\_322, 29 Bra026330\_421, 7 Bra036921\_710, 4 Bra021391\_2227, 43 Bra34190, 56 S2\_2381385, 92 S2\_2696634, 40 Bra022102\_208, 1 Bra000195\_592, 25 Bra001747\_921, 10 S3\_22058874, 34 S3\_22964073, 46 S3\_28281130, 76 Bra023998\_494, 74 Bra014394\_526, 23 S4\_518134, 30 Bra032761\_3759, 89 Bra028210\_473, 35 S4\_7043221, 63 Bra018412\_3729, 59 S5\_13799765, 71 S5\_17417256, 52 Bra022210\_779, 42 Bra034853\_482, 31 Bra039693\_983, 36 S6\_4399453, 87 Bra019747\_1150, 48 S6\_5276553, 17 Bra026058\_1631  
- ei monistuu, + monistuu

Taulukko 7. Jatkuu

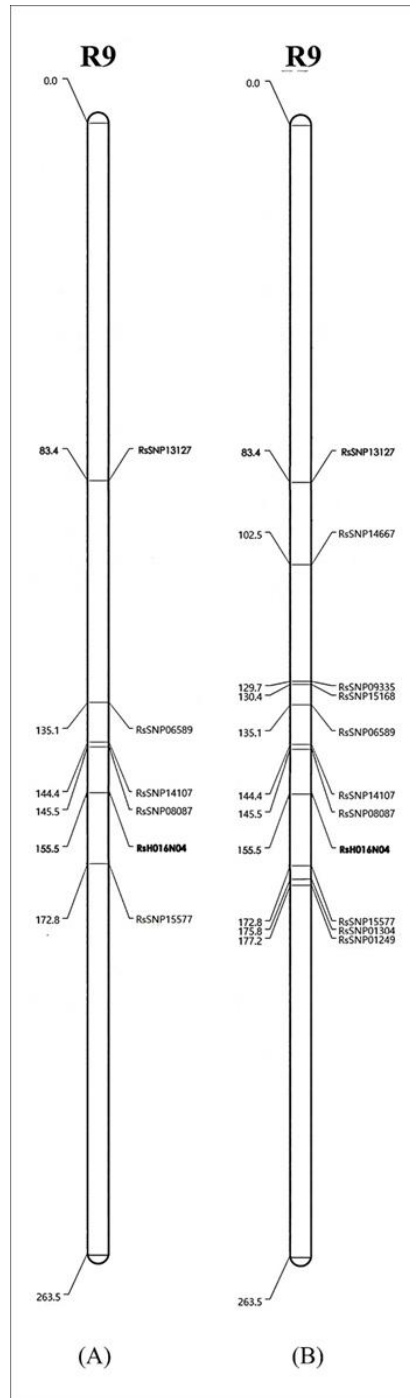
| Koejäsenen<br>koodi |                        | A06   |   |   |   | A07 |   |   |   | A08 |    |   |   | A09 |    |    |    |    |    |    |    | A10 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |
|---------------------|------------------------|---|---|---|---|-----|---|---|---|-----|----|---|---|-----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|----|----|---|
|                     |                        | Rypsin SNP-merkki koodi   |   |   |   |     |   |   |   | 60  | 51 | 2 | 5 | 19  | 38 | 49 | 39 | 96 | 54 | 85 | 13 | 14  | 61 | 90 | 28 | 53 | 64 | 65 | 62 | 86 | 78 | 27 | 6 | 41 | 75 | 16 | 37 | 3 |
| Daikon              | 3., 4.                 | -   | - | - | - | -   | - | + | - | -   | -  | - | - | +   | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -   | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | +  | -  |    |   |
|                     | 2.                     | -   | - | - | - | -   | - | + | - | +   | -  | - | - | +   | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -   | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | -  |    |    |   |
|                     | 5.                     | -   | - | - | - | -   | - | + | - | +   | -  | - | - | +   | +  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -   | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | -  |    |    |   |
|                     | 6.                     | -   | - | - | - | -   | - | + | - | -   | -  | - | - | -   | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -   | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | -  |    |    |   |
| BULK -Daikon        | 1.                     | -   | - | - | - | -   | - | + | - | +   | -  | - | - | +   | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -   | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | -  |    |    |   |
|                     | 2.                     | -   | - | - | - | -   | - | + | - | +   | -  | - | - | -   | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -   | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | -  |    |    |   |
| 4021-2Rfk           | 1.-8.                  | +   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  |    |    |   |
| RfA4                | 1.-8.                  | -   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  |    |    |   |
| R2000               | 1., 2., 3., 6., 8.     | +   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | -   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | + | +  |    |    |    |   |
|                     | 4., 5., 7.             | +   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | + | +  | +  |    |    |   |
| 4021B               | 1.-8.                  | +   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  |    |    |   |
| 58.Cordelia 1.      | 1., 2., 4., 5., 6., 8. | +   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  |    |    |   |
|                     | 3.                     | +   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  |    |    |   |
| Cordelia            | 1., 4., 5., 6., 7., 8. | +   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  |    |    |   |
|                     | 2.                     | +   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  |    |    |   |
| SW Petita           | 2., 3., 5., 6., 7.     | +   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  |    |    |   |
|                     | 1.                     | +   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | + | +  |    |    |    |   |
|                     | 4.                     | +   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  |    |    |   |
|                     | 8.                     | +   | + | + | + | +   | + | + | + | +   | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | +  |    |    |   |
|                     |                        | 60 S6_7320502, 51 Bra018145_216, 2 Bra009766_1031, 5 Bra025101_1013, 19 Bra038819_489, 38 Bra012200_683, 49 Bra003535_1378, 39 Bra016250_425, 96 S7_22216759, 54 Bra035180_1311, 85 S8_8397014, 13 S8_15751223, 14 Bra010747_186, 61 S8_21433770, 90 Bra036254_514, 28 S9_7618398, 53 Bra027057_1007, 64 S9_8224170, 65 Bra027952_1533, 62 S9_12284297, 86 S9_19198556, 78 Bra036047_559, 27 S9_32116439, 6 Bra031154_826, 41 Bra026898_1237, 75 S9_36116104, 16 S9_36713905, 37 Bra003121_282, 3 Bra015507_982, 8 S10_12903912, 73 Bra008631_281 |   |   |   |     |   |   |   |     |    |   |   |     |    |    |    |    |    |    |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |
|                     |                        | - ei monistu, + monistuu  |   |   |   |     |   |   |   |     |    |   |   |     |    |    |    |    |    |    |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |

### 6.2.3 Rypsin risteytysjälkeläistö

Retikan SNP-merkeistä RsSNP07307, RsSNP13127, RsSNP01618 -merkit jätettiin analysoimatta rypsin risteytysjälkeläistöstä, mitkä kontrolleilla todettiin olevan epäinformatiivisia retikan kromosomin siirtymisen selvittämiseen. Myös BAC-SNP-merkki monistui kaikilla negatiivikontrolleilla, mutta positiivikontrolleilla se todettiin liittyvän PPR-B alueen sijaintiin R9-kromosomissa. Rypsille lajispesifisiä ei ollut 9 rypsin SNP-merkkiä sekä S5\_17417256, Bra001747\_921 ja Bra003121\_282 ei monistunut kaikissa rypsi kontrolleissa. Nämä merkit jätettiin analysoimatta rypsin risteytysjälkeläistöstä, koska niillä ei voi havaita mahdollisen R9-kromosomin integraation tapahtumista. Rypsin risteytysjälkeläistön yhdellä yksilöllä jäi monistumatta useita rypsin SNP-merkkejä eikä yksilöä käytetty tulosten analysoinnissa.

SNP-työkalun 28 retikan SNP-merkin monistumista havainnoitiin rypsin risteytysjälkeläistön 20 fertiilillä ja 3 steriilillä yksilöillä (Taulukko 8). Jokaisella rypsin risteytysjälkeläistön yksilöllä monistui BAC-SNP-merkki (RsH016N04). Rypsin risteytysjälkeläistön 18 fertiilillä yksilöllä monistui neljä retikan SNP-merkkiä. Rypsin risteytysjälkeläistön yhdellä fertiilillä yksilöllä havaittiin neljän retikan SNP-merkin lisäksi RsSNP09335 -merkin monistuminen sekä yhdellä fertiilillä yksilöllä monistui RsSNP11584 -merkki. Lisäksi rypsin risteytysjälkeläistön kahdella fertiilillä yksilöllä havaittiin kahden ylimääräisen retikan SNP-merkin monistuminen sekä yhdellä fertiilillä yksilöllä havaittiin neljän ylimääräisen retikan SNP-merkin monistuminen. Rypsin risteytysjälkeläistön yhdellä steriilillä yksilöllä havaittiin yhden retikan SNP-merkin (RsSNP15577) monistuminen sekä yhdellä steriilillä yksilöllä havaittiin RsSNP15577-merkin lisäksi RsSNP08087-merkin monistuminen. Rypsin risteytysjälkeläistön yhdellä steriilillä yksilöllä ei monistunut retikan SNP-merkkejä. Jokaisella rypsin risteytysjälkeläistön 21 jälkeläisellä monistui 48 rypsin SNP-merkkiä (Taulukko 9).

Rypsin risteytysjälkeläistön fertiileillä yksilöillä havaittujen neljän retikan SNP-merkin ja BAC-SNP-merkin minimipituus oli 3,9 megabase (Mb) ja maksimiväli 32,6 Mb. Rapsin jalostuslinja RfA4:ssa ja rypsin R-linja 4021-2 Rfk:ssa retikkafragmentti oli saman kokoinen kuin rypsin risteytysjälkeläistön fertiileillä yksilöillä (Kuva 13). Rapsin jalostuslinja R2000 yksilöillä havaittujen retikan SNP-merkin minimipituus oli 18,1 Mb ja maksimiväli 19,3 Mb. BAC-SNP-merkki (RsH016N04) liittyy suoraan PPR-B-geenialueeseen. Kaikissa retikan kromosomin ylimääräisenä tai integroituneena sisältävissä rapsi-, ja rypsikontrolleissa sekä rypsin risteytysjälkeläistön fertiileillä yksilöillä monistuneet neljä retikan SNP-merkkiä sijaitsevat kromosomissa lähimpänä fertiliteetin palauttavaa PPR-B-geenialuetta.



Kuva 13. Rypsin risteytysjälkeläistön fertiileillä yksilöillä sekä positiivi kontrolli rapsin jalostuslinja RfA4 ja rypsin R-linja 4021-2 Rfk kaikissa yksilönäytteissä (A) monistui 4 retikan SNP-merkkiä (RsSNP06589, RsSNP14107, RsSNP08087, RsSNP15577) (B) Positiivi kontrolli rapsin jalostuslinja R2000-linjan kaikissa yksilönäytteissä monistui 9 retikan SNP-merkkiä (RsSNP13127, RsSNP14667, RsSNP09335, RsSNP15168, RsSNP06589, RsSNP14107, RsSNP08087, RsSNP15577, RsSNP01304, RsSNP01249). BAC-SNP-merkki RsH016N04 liittyy suoraan PPR-B-geeni-alueeseen. Kuvassa on negatiivi kontroleissa havaittu RsSNP13127, joka oli epäinformatiivinen selvittämään retikan kromosomin siirtymistä rypsilä.

Taulukko 8. SNP-työkalun rypsin 21 risteytysjälkeläisen tulokset 28 retikan SNP-merkille. SNP-merkit on järjestetty retikan R9-kromosomin geneettisen kartan mukaan tutkimuksessa annetuilla koodeilla.

| BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub><br>yksilö | Feno-<br>tyyppi | Retikan SNP-merkki koodi |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--|-----------------|--------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|  |                 | 69                       | 22 | 70 | 44 | 84 | 24 | 83 | 79 | 94 | 32 | 93 | 57 | 9 | 80 | 68 | 11 | 67 | 47 | 81 | 20 | 88 | 12 | 18 | 77 | 82 | 95 | 55 | 72 | 45 |
| 2.                                       | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 3.                                       | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 4.                                       | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 5.                                       | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 6.                                       | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 7.                                       | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 8.                                       | F               | -                        | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 9.                                       | F               | -                        | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 10.                                      | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 11.                                      | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 12.                                      | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 13.                                      | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 14.                                      | S               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 15.                                      | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 16.                                      | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 17.                                      | S               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 18.                                      | S               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 19.                                      | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 20.                                      | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | +  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 21.                                      | F               | -                        | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 22.                                      | F               | -                        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  |

69 RsSNP13590, 22 RsSNP10004, 70 RsSNP11584, 44 RsSNP09324, 84 RsSNP15910, 24 RsSNP15732, 83 RsSNP15298, 79 RsSNP07123, 94 RsSNP14667, 32 RsSNP08106,  
 93 RsSNP14170, 57 RsSNP13554, 9 RsSNP12157, 80 RsSNP09967, 68 RsSNP09335, 11 RsSNP15168, 67 RsSNP06589, 47 RsSNP15214, 81 RsSNP14107, 20 RsSNP08087,  
 88 RsH016N04, 12 RsSNP15577, 18 RsSNP01304, 77 RsSNP01249, 82 RsSNP14626, 95 RsSNP15376, 55 RsSNP02753, 72 RsSNP15846, 45 RsSNP13509

F fertiili, S steriili, - ei monistuu, + monistuu



Taulukko 9. SNP-työkalun rypsin 21 risteytysjälkeläisen tulokset 48 rypsin SNP-merkille. SNP-merkit on järjestetty rypsin kromosomiston fysikaalisten sijaintien mukaisesti tutkimuksessa annetuilla koodeilla.

| BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub><br>yksilö | Feno-<br>tyyppi | A01                     |    |    |   |   |    | A02 |    |    | A03 |    |    |    | A04 |    |    |    |    | A05 |    |    |    | A06 |    |    |   |
|--|-----------------|-------------------------|----|----|---|---|----|-----|----|----|-----|----|----|----|-----|----|----|----|----|-----|----|----|----|-----|----|----|---|
|  |                 | Rypsin SNP-merkki koodi |    |    |   |   |    | 56  | 92 | 40 | 1   | 34 | 46 | 76 | 74  | 23 | 30 | 89 | 35 | 63  | 59 | 52 | 42 | 31  | 36 | 87 |   |
|  |                 | 26                      | 50 | 29 | 7 | 4 | 43 |     |    |    |     |    |    |    |     |    |    |    |    |     |    |    |    |     |    |    |   |
| 2.                                       | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 3.                                       | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 4.                                       | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 5.                                       | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 6.                                       | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 7.                                       | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 8.                                       | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 9.                                       | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 10.                                      | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 11.                                      | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 12.                                      | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 13.                                      | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 14.                                      | S               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 15.                                      | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 16.                                      | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 17.                                      | S               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 18.                                      | S               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 19.                                      | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 20.                                      | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 21.                                      | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |
| 22.                                      | F               | +                       | +  | +  | + | + | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +  | + |

26 Bra011803\_290, 50 Bra013533\_322, 29 Bra026330\_421, 7 Bra036921\_710, 4 Bra021391\_2227, 43 Bra34190, 56 S2\_2381385, 92 S2\_2696634, 40 Bra022102\_208,  
1 Bra000195\_592, 34 S3\_22964073, 46 S3\_28281130, 76 Bra023998\_494, 74 Bra014394\_526, 23 S4\_518134, 30 Bra032761\_3759, 89 Bra028210\_473, 35 S4\_7043221,  
63 Bra018412\_3729, 59 S5\_13799765, 52 Bra022210\_779, 42 Bra034853\_482, 31 Bra039693\_983, 36 S6\_4399453, 87 Bra019747\_1150

F fertiili, S steriili, - ei monistuu, + monistuu

Taulukko 9. Jatkuu

| BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub><br>yksilö | Feno-<br>tyyppi | A06                     |    |    |    |   |   | A07 |    |    |    | A08 |    | A09 |    |    |    |    |    |    |   |    |   | A10 |  |
|--|-----------------|-------------------------|----|----|----|---|---|-----|----|----|----|-----|----|-----|----|----|----|----|----|----|---|----|---|-----|--|
|  |                 | Rypsin SNP-merkki koodi |    |    |    |   |   |     |    |    |    |     |    |     |    |    |    |    |    |    |   |    |   |     |  |
|  |                 | 48                      | 17 | 60 | 51 | 2 | 5 | 19  | 38 | 39 | 54 | 85  | 13 | 90  | 28 | 53 | 65 | 62 | 86 | 78 | 6 | 75 | 3 | 73  |  |
| 2.                                       | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 3.                                       | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 4.                                       | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 5.                                       | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 6.                                       | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 7.                                       | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 8.                                       | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 9.                                       | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 10.                                      | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 11.                                      | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 12.                                      | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 13.                                      | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 14.                                      | S               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 15.                                      | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 16.                                      | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 17.                                      | S               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 18.                                      | S               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 19.                                      | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 20.                                      | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 21.                                      | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |
| 22.                                      | F               | +                       | +  | +  | +  | + | + | +   | +  | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | +  | + | +   |  |

48 S6\_5276553, 17 Bra026058\_1631, 60 S6\_7320502, 51 Bra018145\_216, 2 Bra009766\_1031, 5 Bra025101\_1013, 19 Bra038819\_489, 38 Bra012200\_683,  
 39 Bra016250\_425, 54 Bra035180\_1311, 85 S8\_8397014, 13 S8\_15751223, 90 Bra036254\_514, 28 S9\_7618398, 53 Bra027057\_1007, 65 Bra027952\_1533,  
 62 S9\_12284297, 86 S9\_19198556, 78 Bra036047\_559, 6 Bra031154\_826, 75 S9\_36116104, 3 Bra015507\_982, 73 Bra008631\_281

F fertiili, S steriili, - ei monistu, + monistuu

## 7 TULOSTEN TARKASTELU

### 7.1 DNA tietokantojen käytön arviointi

Lajispesifisten retikan SNP-merkkien valintaa varten työhön haettiin rypsin genomien sisältävää tietokantaa. Rypsille ei vielä ole olemassa tietokantaa, mistä johtuen työssä käytettiin saman lajin muihin morfotyyppeihin perustuvia *B. rapa* tietokantoja. Kaikissa koejäsenissä monistui (SNP33) retikan SNP-merkki *in silico* mallinnuksella työkaluun valituista retikan SNP-merkeistä. Sama merkki monistui myös rypsillä, vaikka sille ei löytynyt vastaavuutta *B. rapa* tietokannoista. Tulos saattoi johtua siitä, ettei *B. rapa* tietokannat olleet täysin kattavia rypsille, jolloin sekvenssivertailulla *B. rapa* tietokannasta lajispesifiseksi luokiteltu retikan merkki kuitenkin monistui rypsillä. Tuloksissa BLAST-ohjelma voi antaa väärät sitoutumiskohdat, jos asetetut parametrit eivät ole sopivat hakusekvenssille. Sekvenssivertailussa E-arvon olisi voinut rajata pienemmäksi, mutta huonosti optimoitu alustus haulle voi johtaa merkin monistumiseen vaikkei sen vastaavuutta löytyisi tietokannasta (Heinze 2007).

*In silico* -menetelmän kontrollitoimessa rypsin SNP-merkeille vastaavuutta haettiin retikan tietokannasta. Aiemmin retikkanäytteessä ei ollut monistunut Bra010747\_186 ja S8\_21433770 rypsin SNP-merkit, joille vastaavuus löytyi retikan genomista. Työkalun testauksessa kyseiset rypsin SNP-merkit monistuivat työkalun retikkanäytteissä. Työkalun retikkanäytteet eivät olleet samoja kuin aiemmin rypsin SNP-merkkien lajispesifisyys testaukseen käytetty retikkanäyte. Tästä johtuen tuloksissa havaittiin yksilöllistä eroa saman retikkalajikkeen sisällä. Julkisesti saatavilla olevat genomisekvenssit ovat vain pieni otos koko lajin pan-genomista. Tutkimuksissa *in silico* -mallintamalla voidaan hyötyä jo olemassa olevasta tiedosta mutta varsinainen lajispesifisyys tulisi testata laboratoriossa.

## 7.2 SNP-työkalu toimivuus

SNP-työkalusta hylättiin kontroleilla epävakaaasti monistuneet SNP-merkit sekä teknisesti huonosti analyysissa toimineet SNP-merkit. Rypsin jälkeläisten analysointiin käytettiin SNP-työkalua, jossa retikan SNP-merkit eivät monistuneet rypsi tavanomaisista lajikkeista ja retikkanäytteissä monistumattomia rypsin SNP-merkkejä. Lopullinen SNP-työkalu koostui 28 retikan SNP-merkistä ja 48 rypsin SNP-merkistä, millä tarkasteltiin aineiston rypsin kromosomeja sekä retikan R9-kromosomin kokoa aineistossa. SNP-työkalun testauksessa käytetty BAC-SNP-merkki monistui kaikissa koejäsenissä, mutta kaikissa retikan kromosomin ylimääräisenä tai integroituneena sisältävissä rapsi-, ja rypsi positiivikontrolleissa monistuneet retikan SNP-merkit olivat tutkituista R9-kromosomin merkeistä lähimpänä BAC-SNP-merkkiä. SNP-työkalun testauksessa BAC-SNP-merkki kohdensi fertiliteetin palauttavaa PPR-B-geenialueen sijaintia R9-kromosomissa.

SNP-työkalulla havaittiin rypsin F1-hybridi risteytysjälkeläistön fertiileissä yksilöissä monistuvan RsSNP06589, RsSNP14107, RsSNP08087 ja RsSNP15577. Nämä merkit sijaitsivat R9-kromosomissa lähimpänä fertiliteetin palauttavaa PPR-B-geenialuetta. Myös steriileillä yksilöillä monistui fertiliteetin palauttavaa PPR-B-geenialueen läheltä RsSNP15577 ja RsSNP08087, mutta steriilien sisältämä retikkafragmentti ei palauttanut fertiliteettiä yksilöille. Työssä oletuksena oli, että integroituva retikan kromosomialue poistaisi osan rypsin omasta kromosomista ja rypsin kromosomin osan puuttuminen havaittaisiin SNP-työkalun rypsin SNP-merkkien monistumatta jäämisenä A9-kromosomissa. Lisäksi oletettiin, että jälkeläiset voisi luokitella integroituneisiin ja ylimääräisen kromosomin omaaviin SNP-työkalun rypsin SNP-merkkien avulla. Kuitenkin kaikki rypsin SNP-merkit monistuivat rypsin risteytysjälkeläisillä. Nämä tulokset eivät osoita onko integraatio tapahtunut F1 hybridi risteytysjälkeläistön fertiileillä yksilöillä vai onko fertiliteetin palauttava PPR-B-geenialue vielä ylimääräisenä eli integroitumattomana retikan kromosomina.

Työssä kehitettyä SNP-työkalua ei suoranaisesti sellaisenaan voi hyödyntää rypsin hybridijalostusmenetelmän kehittämisessä, koska integroitumisen seurantaa haluttaisiin tehdä jo rypsin risteytysjälkeläistön ensimmäisen takaisinristeytysten jälkeen, kun yksilöt ovat vielä suurimmaksi osaksi heterotsygootteja. Kaneko ym. (2003) tutkimuksessaan osoittivat, että *R. sativus* x *B. rapa* ( $2n = 19$ ) risteytysjälkeläisten morfologiset piirteet säilyvät genomissa viidenteen takaisinristeytykseen asti (BC5). Tästä johtuen lisää rypsin risteytysjälkeläistön takaisinristeytyksiä tarvitaan tuottamaan homotsygoottisemmat yksilöt, jotta SNP-työkalulla olisi havaittavissa rypsin SNP-merkkien monistumatta jääminen integraatiokohdasta. Tutkimuksissa on osoitettu, että R ja A genomien kromosomien koko ja rakenne ovat samankaltaiset sekä ne sisältävän samankaltaisia alueita (Shirasawa ym. 2011, Hwang ym. 2012). Takaisinristeytyksissä retikan kromosomi on integroitunut rypsin kromosomien kanssa (Tonosaki ym. 2014), jolloin rypsin risteytysjälkeläistössä integroitumattoman retikan kromosomin on mahdollista liittyä rypsin genomiin. Jalostusohjelmassa DNA-valintamerkkeinä voisi käyttää rypsin risteytysjälkeläistön fertiileissä monistuneita RsSNP06589 ja RsSNP14107, jotka eivät monistuneet steriileillä. Tällöin kasvuvaiheessa olevat yksilöt voitaisiin testata valintamerkkien avulla ja jaotella yksilöt fertiileihin sekä steriileihin ennen kuintavaihetta.

Rapsin jalostuslinja R2000 C genomien kromosomissa on tiedettävästi integroituneena *Rfo*-geeni, joka havaittiin tuloksissa isona retikkafragmenttina. Työssä oletuksena oli, että rapsin jalostuslinja RfA4 sisältää todennäköisesti PPR-B-geenialueen ylimääräisessä retikan kromosomissa tai kromosomin osassa, jolloin kaikki tutkitut R9-kromosomin merkit monistuisivat tai vain osa merkeistä R9-kromosomin päistä. Näin kuitenkin ei tapahtunut ja tuloksissa rapsin jalostuslinja RfA4:ssa havaittiin vain samojen merkkien monistumista, kuin rypsin risteytysaineiston fertiileillä yksilöillä. Myös rypsin R-linja 4021-2 Rfk useammalla yksilöllä monistui samat neljä retikan SNP-merkkiä kuin rypsin risteytysaineiston fertiileillä yksilöillä. Lisäksi rypsin R-linja 4021-2 Rfk yhdellä yksilöllä havaittiin monistuvan useampi retikan

merkki, kuten Niemelä ym. (2012) tunnistivat fluoresenssi *in situ* hybridisaatio (FISH)-menetelmällä rypsin R-linja 4021-2 Rfk genomista ylimääräisen kromosomin. Kuitenkin SNP-työkalun retikan SNP-merkkien avulla havaittiin, että rypsin R-linjassa 4021-2 Rfk useammalla yksilöllä jäi monistumatta useita retikan SNP-merkkejä R9-kromosomin päistä, kuin myös rypsin jalostuslinja RfA4:ssa. Nämä tulokset osoittavat, ettei integroitumaton retikan kromosomi ole kokonaisena rypsin jalostuslinja RfA4 ja rypsin R-linja 4021-2 Rfk genomissa.

## 8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Työssä tavoitteena oli kehittää R9-kromosomialueiden tunnistamiseen SNP-työkalu. SNP-työkalun kehittämistä varten valittiin *B.rapa* tietokantoja, joilla valittujen SNP-merkkien lajispesifisyys testattiin laboratoriossa. Työssä kehitetty SNP-työkalu koostui lajispesifisistä 28 retikan SNP-merkistä ja 48 rypsin SNP-merkistä. Tuloksissa havaittiin rypsin risteytysjälkeläistön fertiileillä yksilöillä neljän retikan SNP -merkin monistuminen, mitkä sijaitsevat R9-kromosomissa lähimpänä fertiliteetin palauttavaa PPR-B-geenialuetta. Kuitenkaan SNP-työkalulla ei pystynyt osoittamaan onko integraatio tapahtunut tutkitun aineiston fertiileillä yksilöillä vai onko fertiliteetin palauttava PPR-B-geenialue vielä integroitumattomana retikan kromosomina, koska kaikki SNP-työkalun rypsin SNP-merkit monistuivat rypsin risteytysjälkeläisillä. Työssä rypsin risteytysjälkeläistön fertiileissä monistuneita retikan SNP-merkkejä voisi käyttää DNA-valintamerkkeinä tunnistettaessa yksilöitä, joilla on fertiliteetin F1 hybrideissä palauttava PPR-B-geenialue rypsin genomissa. Suoranaisesti sellaisenaan työssä kehitettyä SNP-työkalua ei voi hyödyntää rypsin hybridijalostusmenetelmän kehittämisessä, koska integroitumisen seurantaa haluttaisiin tehdä jo rypsin risteytysjälkeläistön F1 hybrideissä. Tässä tutkimuksessa SNP-työkalun avulla selvisi, että genomissa ylimääräisenä oleva retikan kromosomi ei ole kokonaisena.

## LÄHTEET

- Akbar, M. 1989. Resynthesis of *Brassica napus* aiming for improved earliness and carried out by different approaches. *Hereditas* 111: 239-246.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. & Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-10.
- Bannerot, H., Bouldard, L. & Chupeau, Y. 1977. Unexpected difficulties met with the radish cytoplasm in *Brassica oleracea*. *Cruciferae Newsletter* 2:16.
- Bannerot, H., Bouldard, L., Cauderon, Y. & Tempe, J. 1974. Cytoplasmic male sterility transfer from *Raphanus* to *Brassica*. *Proceedings Eucarpia Meeting. Cruciferae Crop Section* 25: 52-54.
- Batley, J., Mogg, R., Edwards, D., O'Sullivan, H. & Edwards, K. 2003. A high-throughput SNUPE assay for genotyping SNPs in the flanking regions of *Zea mays* sequence tagged simple sequence repeats. *Molecular Breeding* 11: 111-120.
- Bell, R., Helentjaris, T., Neuhausen, S. & Shattuck-Eidens, D. 1990. DNA sequence variation within maize and melon: observations from polymerase chain reaction amplification and direct sequencing. *Genetics* 126: 207-217.
- Bennett, R., Thiagarajah, M., King, J. & Rahman, M. 2008. Interspecific cross of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* and *B. napus*: effects of growth condition and silique age on the efficiency of hybrid production, and inheritance of erucic acid in the self-pollinated backcross generation. *Euphytica* 164: 593-60.
- Bonnet, A. 1975. Introduction et utilisation d'une stérilité mâlecitoplasmique dans des variétés précoces européennes de radis *Raphanus sativus* L. *Ann. Amélior. Plantes* 25: 381-397.
- Brookes, A. 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234:177-186.

- Brown J. & Caligari, P. 2008. An Introduction to Plant Breeding. 1st ed., Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 209 p.
- Budar, F. & Pelletier, G. 2001. Male Sterility in Plants; Occurrence, Determinism, Significance and Use. *Life Science* 324: 543-550.
- Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I., Tang, H., Wang, X., Chiquet, J., Belcram, H., Tong, C., Samans, B. Corr  a, M., Da Silva, C., Just, J., Falentin, C., Koh, C., Le Clainche, I., Bernard, M., Bento, P., Noel, B., Labadie, K., Alberti, A., Charles, M., Arnaud, D., Guo, H., Daviaud, C., Alamery, S., Jabbari, K., Zhao, M., Edger, P., Chelaifa, H., Tack, D., Lassalle, G., Mestiri, I., Schnel, N., Le Paslier, M., Fan, G., Renault, V., Bayer, P., Golicz, A., Manoli, S., Lee, T., Thi, V., Chalabi, S., Hu, Q., Fan, C., Tollenaere, R., Lu, Y., Battail, C., Shen, J., Sidebottom, C., Wang, X., Canaguier, A., Chauveau, A., B  rard, A., Deniot, G., Guan, M., Liu, Z., Sun, F., Lim, Y., Lyons, E., Town, C., Bancroft, I., Wang, X., Meng, J., Ma, J., Pires, J., King, G., Brunel, D., Delourme, R., Renard, M., Aury, J., Adams, K., Batley, J., Snowden, R., Tost, J., Edwards, D., Zhou, Y., Hua, W., Sharpe, A., Paterson, A., Guan, C. & Wincker, P. 2014. Early allopolyploid evolution in the postneolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 345: 950-953.
- Chang, H., Chuang, L., Cheng, Y., Hung, Y., Wen, C., Gu, D. & Yang, C. 2009. Prim-SNPing: a primer designer for cost effective SNP genotyping. *Biotechniques* 46 pp. 421-431.
- Chen, B., Heneen, W. & J  nsson, R. 1988. Resynthesis of *Brassica napus* L. through interspecific hybridization between *B. alboglabra* Bailey and *B. campestris* L. with special emphasis on seed colour. *Plant Breeding* 101: 52-59.
- Cheng, F., Liang, J., Cai, C., Cai, X., Wu, J. & Wang, X. 2017. Genome sequencing supports a multivertex model for Brassiceae species. *Current Opinion in Plant Biology* 36: 79-87.



- Cheng, F., Mandakova, T., Wu, J., Xie, Q. Lysak, M. & Wang, X. 2013. Deciphering the diploid ancestral genome of the mesohexaploid *Brassica rapa*. *Plant Cell* 25: 1541-1554.
- Clegg, M. & Gaut B. 1993. Nucleotide polymorphism in the *Adh1* locus of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae). *Genetics* 135: 1091-1097.
- Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6: 836-846.
- Dayhoff, M., Schwartz, R. & Orcutt, B. 1978. A Model of Evolutionary Change in Proteins. Teoksessa: Dayhoff, M. (toim.) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation Washington DC p. 345-352.
- Delourme, R., Eber, F. & Renard, M. 1991. Radish cytoplasmic male sterility in rapeseed: breeding restorer lines with good female fertility. In: *Proceedings, 9th International Rapeseed Congress*, Cambridge, UK, p. 6-8.
- Delourme, R., Eber, F. & Renard, M. 1994. Transfer of radish cytoplasmic male sterility from *Brassica napus* to *B. juncea* and *B. rapa*. *Cruciferae Newsletter* 16: 79.
- Delourme, R., Eber, F. & Renard, M. 1995. Breeding double low restorer lines in radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). In: *Proceedings, 8th International Rapeseed Congress*, Saskatoon, Canada, p. 1506-1510.
- Delourme, R., Foisset, N., Horvais, R., Barret, P., Champagne, G., Cheung, W., Landry, B. & Renard, M. 1998. Characterisation of the radish introgression carrying the *Rfo* restorer gene for the Ogu-INRA cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 97: 129-134.
- Desloire, S., Gherbi, H., Laloui, W., Marhadour, S., Clouet, V., Cattolico, L., Falentin, C., Giancola, S., Renard, M., Budar, F., Small, I., Caboche, M., Delourme, R. & Bendahlmane, A. 2003. Identification of the

fertility restoration locus, Rfo, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Reports* 4: 588-594.

Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus* 12: 13-15.

Duran, C., Appleby, N., Clark, T., Wood, D., Imelfort, M., Batley, J. & Edwards, D. 2009. AutoSNPdb: an annotated single nucleotide polymorphism database for crop plants. *Nucleic Acids Research* 37: 951-953.

Ellerström, S. 1978. Species crosses and sterility in *Brassica* and *Raphanus*. *Cruciferae Newsletter, Eucarpia* 3: 16-17.

Feng, J., Primomo, V., Li, Z., Zhang, Y., Jan, C., Tulsieram, L. & Xu S. 2009. Physical localization and genetic mapping of the fertility restoration gene Rfo in canola (*Brassica napus* L.). *Genome* 52: 401-407.

Fluidigm Corporation 2018. Fluidigm SNP genotyping user guide. <https://www.fluidigm.com/binaries/content/documents/fluidigm/resources/snpgt-analysis-ug-68000098/snpgt-analysis-ug-68000098/fluidigm%3Afile>. SNP Type™ Assays for SNP Genotyping on the Dynamic Array™ IFCs s. 139-146. Viitattu 21.3.2019.

Gupta, P., Roy, J. & Prasad, M. 2001. Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science* 80: 524-535.

Gupta, S. 1997. Production of interspecific and intergeneric hybrids in *Brassica* and *Raphanus*. *Cruciferae Newsletter, Eucarpia* 19: 21-22.

Hawliczek-Strulak, A., Bartoszewski, G., Słomnicka, R. Korzeniewska, A., Delourme, R., Bartkowiak-Broda, I. & Niemirowicz-Szczytt, K. 2015. PPR-B-31: a new maintainer allele in the male-fertility restorer gene of radish (*Raphanus sativus*) Ogura cytoplasm. *Plant Breeding* 134: 557-563.

- Heinze, B. 2007. A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant Methods* 3: 4.
- Henikoff, S. & Henikoff, J. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Academy of Sciences of the United States of America*. 89: 10915 -9.
- Heyn, F. 1976. Transfer of restorer genes from *Raphanus* to cytoplasmic male sterile *Brassica napus*. *Cruciferae Newsletter* 1: 15-16.
- Hu, X., Sullivan-Gilbert, M., Kubik, T., Danielson, J., Hnatiuk, N., Marchione, W., Greene, T. & Thompson, S.A. 2008. Mapping of the Ogura fertility restorer gene *Rfo* and development of *Rfo* allelespecific markers in canola (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding* 22: 663-674.
- Hwang, Y.-J., Yu, H.-J., Mun, J.-H., Ryu, K., Park, B.-S. & Lim, K.-B. 2012. Centromere repeat DNA originated from *Brassica rapa* is detected in the centromere re-gion of *Raphanus sativus* chromosomes. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* 30: 751-756.
- Jeong, Y., Chung, W., Choi, A., Mun, J., Kim, N. & Yu, H. 2016. The complete mitochondrial genome of cultivated radish WK10039 (*Raphanus sativus* L.). *Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis* 27: 941-942.
- Kaneko, Y., Yano, H., Bang, S. & Matsuzawa, Y. 2003. Genetic stability and maintenance of *Raphanus sativus* lines with an added *Brassica rapa* chromosome. *Plant Breeding* 122: 239-243.
- Khlestkina, E. & Salina, E. 2006. SNP markers: methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat. *Russian Journal of Genetics* 42: 585-594.
- Leflon, M., Eber, F., Letanneur, J., Chelysheva, L., Coriton, O., Huteau, V., Ryder, C., Barker, G., Jenczewski, E. & Chèvre, A. 2006. Pairing and recombination at meiosis of *Brassica rapa* (AA) x *Brassica napus* (AACC) hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1467-1480.

- Lipman, D. & Pearson, W. 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 227: 1435-41.
- Liu, S., Liu, Y., Yang, X., Tong, C., Edwards, D., Parkin, I. A., Zhao, M., Ma, J., Yu, J., Huang, S., Wang, X., Wang, J., Lu, K., Fang, Z., Bancroft, I., Yang, T. J., Hu, Q., Wang, X., Yue, Z., Li, H., Yang, L., Wu, J., Zhou, Q., Wang, W., King, G., Pires, J., Lu, C., Wu, Z., Sampath, P., Wang, Z., Guo, H., Pan, S., Yang, L., Min, J., Zhang, D., Jin, D., Li, W., Belcram, H., Tu, J., Guan, M., Qi, C., Du, D., Li, J., Jiang, L., Batley, J., Sharpe, A., Park, B., Ruperao, P., Cheng, F., Waminal, N., Huang, Y., Dong, C., Wang, L., Li, J., Hu, Z., Zhuang, M., Huang, Y., Huang, J., Shi, J., Mei, D., Liu, J., Lee, T., Wang, J., Jin, H., Li, Z., Li, X., Zhang, J., Xiao, L., Zhou, Y., Liu, Z., Liu, X., Qin, R., Tang, X., Liu, W., Wang, Y., Zhang, Y., Lee, J., Kim, H. H., Denoeud, F., Xu, X., Liang, X., Hua, W., Wang, X., Wang, J., Chalhoub, B. & Paterson, A. H. 2014. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature Communications* 5: 3930.
- Lysak, M., Koch, M., Pecinka, A. & Schubert, I. 2005. Chromosome triplication found across the tribe Brassiceae. *Genome Research* 15: 516-525.
- Mun, J., Chung, H., Chung, W., Oh, M., Jeong, Y., Kim, N., Ahn, B., Park, B., Park, S., Lim, K., Hwang, Y. & Yu, H. (2015) Construction of a reference genetic map of *Raphanus sativus* based on genotyping by whole genome resequencing. *Theoretical and Applied Genetics* 128: 259-272.
- Nagaharu, U. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *The Journal of Japanese Botany* 7: 389-452.
- Nicolas, S., Leflon, M., Liu, Z., Eber, F., Chelysheva, L., Coriton, O., Chèvre, A.M., & Jenczewski, E. 2008. Chromosome 'speed dating' during meiosis of polyploid *Brassica* hybrids and haploids. *Cytogenet. Genome Research* 120: 331-338.

- Niemelä, T. 2013. Developing a hybrid breeding system for turnip rape. Dissertation, University of Helsinki, Department of Agricultural Sciences, Publications 16, 47 p.
- Niemelä, T., Seppänen, M., Badakshi, F., Rokka, V-M. & Heslop-Harrison, J-S. 2012. Size and location of radish chromosome regions carrying the fertility restorer Rfk1 gene in spring turnip rape. *Chromosome Research* 20: 353-361.
- Niemelä, T., Seppänen, M., Jauhiainen, L. & Tulisalo, U. 2010. Transfer of the Kosena Rfk1 gene, required in hybrid seed production, from oilseed rape to turnip rape. *Euphytica* 175: 112.
- Ogura, H. 1968. Studies on the new male-sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University* 2: 39-78.
- Paris, M., Potter, R., Lance, R., Li, C., & Jones, M. 2003. Typing Mlo alleles for powdery mildew resistance in barley by single nucleotide polymorphism analysis using MALDI-ToF mass spectrometry. *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 1343-1349.
- Parkin, I., Koh, C., Tang, H., Robinson, S., Kagale, S., Clarke, W., Town, C., Nixon, J., Krishnakumar, V., Bidwell, S., Denoeud, F., Belcram, H., Links, M. G., Just, J., Clarke, C., Bender, T., Huebert, T., Mason, A., Pires, J., Barker, G., Moore, J., Walley, P., Manoli, S., Batley, J., Edwards, D., Nelson, M., Wang, X., Paterson, A., King, G., Bancroft, I., Chalhoub, B. & Sharpe, A. 2014. Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome Biology* 15: R77.
- Paulmann, W. & Röbbelen, G. 1988. Effective transfer of cytoplasmic male sterility from radish (*Raphanus sativus* L.) to rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding* 100: 299-309.

- Primard-Brisset, C., Poupard, J., Horvais, R., Eber, F., Pelletier, G. & Delourme, R. 2005. A new recombined double low restorer line for the Ogu-INRA cms in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 111: 736-746.
- Rafalski, A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 94-100.
- Rahman, M. 2004. Resynthesis of *Brassica napus* for self-incompatibility: Self-incompatibility reaction, inheritance and breeding potential. *Plant Breeding* 124: 13-19.
- Rahman, M., McVetty, P. & Li, G. 2007. Development of SRAP, SNP and multiplexed SCAR molecular markers for the major seed coat color gene in *Brassica rapa* L. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 1101-1107.
- Rhee, W., Cho, Y., & Paek, K. 1997. Seed formation and phenotypic expression of intra-, and inter-specific hybrids of *Brassica* and of intergeneric hybrids obtained by crossing with *Raphanus*. *Journal of Korean Society of Horticultural Science* 38: 353-360.
- Sakai, T., Liu, H., Iwabuchi, M., Kohno-Murase, J. & Imamura, J. 1996. Introduction of a gene from fertility restored radish (*Raphanus sativus*) into *Brassica napus* by fusion of X-irradiated protoplasts from a radish restorer line and iodacetoamide treated protoplasts from a cytoplasmic male-sterile cybrid of *B.napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 373-379.
- Shen, D., Sun, H., Huang, M., Zheng, Y., Li, X. & Fei, Z. 2013. RadishBase: A Database for Genomics and Genetics of Radish. *Plant Cell Physiology* 54: 169-170.
- Shirasawa, K., Oyama, M., Hirakawa, H., Sato, S., Tabata, S., Fujioka, T., Kimizuka-Takagi, C., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kato, M., Kishida, Y., Kohara, M., Takahashi, C., Tsuruoka, H., Wada, T., Sakai, T. &

- Isobe, S. 2011. An EST-SSR linkage map of *Raphanus sativus* and comparative genomics of the Brassicaceae. *DNA Research* 18: 221-232.
- Shirasawa, K., Shiokai, S., Yamaguchi, M., Kishitani, S. & Nishio, T. 2006. Dot-blot-SNP analysis for practical plant breeding and cultivar identification in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 147-155.
- Snowdon, R. 2007. Cytogenetics and genome analysis in Brassica crops. *Chromosome Research* 15: 85-95.
- Sobrino, B., Briona, M. & Carracedoa, A. 2005. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International* 154: 181-194.
- Sovero, M. 1987. Cytoplasmic male sterility in turnip rape (*Brassica campestris* L.). Dissertation, University of Manitoba, 132 p.
- Stefansson, B. & Downey, R. 1995. Rapeseed. Teoksessa: Slinkard, A. & Knott, D. Harvest of gold: the history of field crop breeding in Canada. University Extension Press, University of Saskatchewan, Saskatoon, Kanada s. 140-152.
- Tanhuanpää, P., Erkkilä, M., Tenhola-Roininen, T. Tanskanen, J. & Manninen, O. 2015. SNP diversity within and among *Brassica rapa* accessions reveals no geographic differentiation. *Genome* 59: 11-21.
- Tonosaki, K., Akaba, M., Bang, S., Kitashiba, H., Kaneko, Y. & Nishio, T. 2014. The use of species-specific DNA markers for assessing alien chromosome transfer in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea* monosomic additions of *Raphanus sativus*. *Molecular Breeding* 34: 1301-1311.
- Uyttewaal, M., Arnal, N., Quandrado, M., Martin-Canadell, A., Vrielynck, N., Hiard, S., Gherbi, H., Bendahmane, A., Budar, F. & Mireau, H. 2008. Characterization of *Raphanus sativus* pentatricopeptide repeat proteins encoded by the fertility restorer locus for Ogura cytoplasmic male sterility. *The Plant Cell* 20: 3331-3345.

- Vignal, A., Milana, D., Sancristobala, M. & Eggenb, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* 34: 275-305.
- Wallace, R., Shaffer, J., Murphy, R., Bonner, J., Hirose, T. & Itakura, K. 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Research* 6: 3543-3557.
- Wang, Y., Chu, P., Yang, Q., Chang, S. Chen, J., Maolong, Hu. & Guan., R. 2014. Complete Mitochondrial Genome of *Eruca sativa* Mill. (Garden Rocket). *Public Library of Science* 9: e105748.
- Wang., X., Wang, H., Wang, J., Sun, R., Wu, J., Liu, S., Bai, Y., Mun, J., Bancroft, I., Cheng, F., Huang, S., Li, X., Hua, W., Wang, J., Wang, X., Freeling, M., Pires, J., Paterson, A., Chalhoub, B., Wang, B., Hayward, A., Sharpe, A., Park, B., Weisshaar, B., Liu, B., Li, B., Liu, B., Tong, C., Song, C., Duran, C., Peng, C., Geng, C., Koh, C., Lin, C., Edwards, D., Mu, D., Shen, D., Soumpourou, E., Li, F., Fraser, F., Conant, G., Lassalle, G., King, G. J., Bonnema, G., Tang, H., Wang, H., Belcram, H., Zhou, H., Hirakawa, H., Abe, H., Guo, H., Wang, H., Jin, H., Parkin, I., Batley, J., Kim, J. S., Just, J., Li, J., Xu, J., Deng, J., Kim, J. A., Li, J., Yu, J., Meng, J., Wang, J., Min, J., Poulain, J., Wang, J., Hatakeyama, K., Wu, K., Wang, L., Fang, L., Trick, M., Links, M., Zhao, M., Jin, M., Ramchi-ary, N., Drou, N., Berkman, P., Cai, Q., Huang, Q., Li, R., Tabata, S., Cheng, S., Zhang, S., Zhang, S., Huang, S., Sato, S., Sun, S., Kwon, S. J., Choi, S. R., Lee, T. H., Fan, W., Zhao, X., Tan, X., Xu, X., Wang, Y., Qiu, Y., Yin, Y., Li, Y., Du, Y., Liao, Y., Lim, Y., Narusaka, Y., Wang, Y., Wang, Z., Li, Z., Wang, Z., Xiong, Z. & Zhang, Z. 2011. Brassica rapa Genome Sequencing Project Consortium The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics* 43: 1035-1039.
- Wangkumhang, P., Chaichoompu, K., Ngamphiw, C., Ruangrit, U., Chanprasert, J., Assawamakin, A. & Tongsim, S. 2007. WASP: a Web-



- based Allele-Specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. *BMC Genomics* 8: 275.
- Wijnker, E. & de Jong, H. 2008. Managing meiotic recombination in plant breeding. *Trends Plant Science* 13: 640-6.
- Wise, R. & Pring, D. 2002. Nuclear-mediated mitochondrial gene regulation and male fertility in higher plants: Light at the end of the tunnel? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10240-10242.
- Yang, J., Liu, D., Wang, X., Ji, C., Cheng, F., Liu, B., Hu, Z., Chen, S., Pental, D., Ju, Y., Yao, P., Li, X., Xie, K., Zhang, J., Wang, J., Liu, F., Ma, W., Shopan, J., Zheng, H., Mackenzie, S. A. & Zhang, M. 2016. The genome sequence of allopolyploid *Brassica juncea* and analysis of differential homoeolog gene expression influencing selection. *Nature Genetics* 48: 1225-1232.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target specific primers for polymerase chain reaction *BMC Bioinformatics* 13 p. 134.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, C., Tong, W., Cong, L., Geng, J., Han, Y., Li, L., Li, W., Hu, G., Huang, X., Li, W., Li, J., Liu, Z., Li, L., Liu, J., Qi, Q., Liu, J., Li, L., Li, T., Wang, X., Lu, H., Wu, T., Zhu, M., Ni, P., Han, H., Dong, W., Ren, X., Feng, X., Cui, P., Li, X., Wang, H., Xu, X., Zhai, W., Xu, Z., Zhang, J., He, S., Zhang, J., Xu, J., Zhang, K., Zheng, X., Dong, J., Zeng, W., Tao, L., Ye, J., Tan, J., Ren, X., Chen, X., He, J., Liu, D., Tian, W., Tian, C., Xia, H., Bao, Q., Li, G., Gao, H., Cao, T., Wang, J., Zhao, W., Li, P., Chen, W., Wang, X., Zhang, Y., Hu, J., Wang, J., Liu, S., Yang, J., Zhang, G., Xiong, Y., Li, Z., Mao, L., Zhou, C., Zhu, Z., Chen, R., Hao, B., Zheng, W., Chen, S., Guo, W., Li, G., Liu, S., Tao, M., Wang, J., Zhu, L., Yuan, L. & Yang, H. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296: 79-92.

## LIITE 1: IUPAC NUKLEOTIDIKOODIT

Taulukko 1. Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUPAC) nukleotidikoodit.

| Nukleotidikoodi | Selite                            |
|-----------------|-----------------------------------|
| A               | adeniini                          |
| C               | sytosiini                         |
| G               | guaniini                          |
| T               | tymiini                           |
| U               | urasiili                          |
| M               | A tai C ( <u>a</u> mino)          |
| K               | G tai T ( <u>k</u> eto)           |
| R               | A tai G ( <u>p</u> urine)         |
| Y               | C tai T ( <u>p</u> rimidine)      |
| S               | A tai T ( <u>s</u> trong)         |
| W               | C tai G ( <u>w</u> weak)          |
| V               | A, C tai G                        |
| H               | A, C tai T                        |
| D               | A, G tai T                        |
| B               | C, G tai T                        |
| -               | aukko, määrittelemätön pituus     |
| N               | A, C, G, tai T ( <u>u</u> nknown) |

## LIITE 2: SNP-TYÖKALUSSA KÄYTETYT SNP-MERKIT

Taulukko 1. SNP-työkalussa käytettyjen SNP-merkkien nimet, alleelit ja alukkeet sekä lisäksi tutkimuksessa merkille annetut koodit.

| Koodi  | Merkin nimi    | Alleeli | Forward aluke                          | Reverse aluke                          |
|--------|----------------|---------|--|--|
| SNP 1  | Bra000195_592  | TG      | gaaattaacacagcaagtgga gct              | gaaattatcacagcaagtgga gcg              |
| SNP 2  | Bra009766_1031 | TC      | ccgttagtatcatttcagattaatgccaa          | ccgttagtatcatttcagattaatgccag          |
| SNP 3  | Bra015507_982  | TC      | agcttacgtttgtaatagaagactct             | gcttacgtttgtaatagaagactcc              |
| SNP 4  | Bra021391_2227 | AC      | gatatcaactgactgcattttcca               | gatatcaactgactgcattttccc               |
| SNP 5  | Bra025101_1013 | TC      | gaacaaatcaacagagggatgaagaa             | gaacaaatcaacagagggatgaagag             |
| SNP 6  | Bra031154_826  | TC      | tttctccgggtgattatgttactaataacaca       | tttctccgggtgattatgttactaataacacg       |
| SNP 7  | Bra036921_710  | TC      | gcttctgggtactgttaattcttctctta          | cttctgggtactgttaattcttctcttg           |
| SNP 8  | S10_12903912   | GA      | aatgccgtcttggctggaatgc                 | caatgccgtcttggctggaatgc                |
| SNP 9  | RsSNP12157     | CT      | catcagcttaatacatcacacacgc              | acatcagcttaatacatcacacacgc             |
| SNP 10 | S3_22058874    | CT      | ggactatcagcaagctatccctc                | ggactatcagcaagctatccctt                |
| SNP 11 | RsSNP15168     | TA      | ggcaaaaccgtgaatagatgtgat               | ggcaaaaccgtgaatagatgtgaa               |
| SNP 12 | RsSNP15577     | TC      | tatatttacacatacatataaacttgaatgaatctgt  | tatatttacacatacatataaacttgaatgaatgc    |
| SNP 13 | S8_15751223    | TC      | ttgctcgtttcatctcaataacatct             | ttgctcgtttcatctcaataacatcc             |
| SNP 14 | Bra010747_186  | TG      | ggacctctcgatgcttatcaaca                | ggacctctcgatgcttatcaacc                |
| SNP 15 | S9_2081300     | TC      | ggactctttatctgttaactgca gct            | ggactctttatctgttaactgca gcc            |
| SNP 16 | S9_36713905    | GT      | gcagtaaatctggattgttcttggatata          | gcagtaaatctggattgttcttggatata t        |
| SNP 17 | Bra026058_1631 | TC      | cgtggttaga ttataaaattccaccaact         | cgtggttaga ttataaaattccaccaacc         |
| SNP 18 | RsSNP01304     | AC      | gattaaagggttagga taacatatagaacaa gcaat | gattaaagggttagga taacatatagaacaa gcaat |
| SNP 19 | Bra038819_489  | AC      | ccatcacacgtagaac ccttggtaaatttaaa      | ccatcacacgtagaac ccttggtaaatttaa ac    |
| SNP 20 | RsSNP08087     | GT      | aaactctctgggtagatcatgcttc              | gaacactctctgggtagatcatgctta            |
| SNP 21 | RsSNP13074     | AT      | attgggttaactaaaagccttagttacaaaaat      | attgggttaactaaaagccttagttacaaaaaa      |
| SNP 22 | RsSNP10004     | TC      | tactttgtagtctgacaattttatattata         | tactttgtagtctgacaattttatattatg         |
| SNP 23 | S4_518134      | CT      | aaagaagagtggaatcttttgcatgg             | gaagaagagagtggaatcttttgcatga           |
| SNP 24 | RsSNP15732     | AT      | aaagtaagcgttgattataacttagggga aa       | aaagtaagcgttgattataacttaggggaat        |
| SNP 25 | Bra001747_921  | TC      | gcggctctgtagttttcaca                   | gcggctctgtagttttcagc                   |
| SNP 26 | Bra011803_290  | TC      | ctctaaagcacacaccgcaaacctt              | ctctaaagcacacaccgcaaaccttc             |
| SNP 27 | S9_32116439    | TA      | gcgtacgaagcctttcagct                   | gcgtacgaagcctttcagca                   |
| SNP 28 | S9_7618398     | GA      | ctttgtagacaataacgggtttctcacg           | actttgtagacataatacgggtttctcaca         |
| SNP 29 | Bra026330_421  | TC      | cccaagtcattcaacaaacttataat             | cccaagtcattcaacaaacttataac             |
| SNP 30 | Bra032761_3759 | TC      | cttgtagaacttgagggaatcgtt               | tttgtagaacttgagggaatcgtc               |
| SNP 31 | Bra039693_983  | TC      | ttgcacatttgatgccccttgg                 | ttgcacatttgatgccccttggc                |
| SNP 32 | RsSNP08106     | AG      | caatacccatcgtaaacatcaaacgtg            | aataccatcgtaaacatcaaacgtgc             |
| SNP 33 | RsSNP13127     | GA      | ctcatcccatatctctatctctgc               | cccatcccatatctctatctctcgt              |
| SNP 34 | S3_22964073    | TA      | tctgtttttcttatctgaaaaaggttgcaatataat   | tctgtttttcttatctgaaaaaggttgcaatataata  |
| SNP 35 | S4_7043221     | CT      | tctcaagaagactcaacaaaaagagaaaaaac       | ttctcaagaagactcaacaaaaagagaaaaaat      |
| SNP 36 | S6_4399453     | AG      | gggtactgtcaatggcggactt                 | gggtactgtcaatggcggactc                 |
| SNP 37 | Bra003121_282  | TG      | agtttcaataattactatctgttgatccgggtta     | gtttcaataattactatctgttgatccgggttc      |
| SNP 38 | Bra012200_683  | TC      | gggactacctgaaaagcaaacaa                | gggactacctgaaaagcaaaaacag              |
| SNP 39 | Bra016250_425  | AT      | gggtgcaatcgcatatttctgttaaat            | gggtgcaatcgcatatttctgtctaaa            |
| SNP 40 | Bra022102_208  | TC      | cgattatttcaaggctggtagagca              | gaattatttcaaggctggtagagcg              |
| SNP 41 | Bra026898_1237 | AT      | tcaatgggtcatcatcgcga                   | tcaatgggtcatcatcgcgt                   |
| SNP 42 | Bra034853_482  | AG      | gggcttctcaagtaaggga aa                 | gggcttctcaagtaagggaag                  |

(Jatkuu)

## Taulukko 1. Jatkuu

| Koodi  | Merkin nimi    | Alleeli | Forward aluke                            | Reverse aluke                            |
|--------|----------------|---------|--|--|
| SNP 43 | Bra34190       | TC      | actgacgga tgcctctcga                     | actgacgga tgcctctcga                     |
| SNP 44 | RsSNP09324     | GA      | tttgaatgcataagctctgagattcttg             | actttgaatgcataagctctga gattctta          |
| SNP 45 | RsSNP13509     | TC      | agaatcctgctggaaaagacagtttat              | gaatcctgctggaaaagacagttta c              |
| SNP 46 | S3_28281130    | CA      | ggccaagttaccaccaaactg                    | ggccaagttaccaccaaactt                    |
| SNP 47 | RsSNP15214     | TG      | acttctgacatacttcagatactcatatgttat        | acttctgacatacttcagatactcatatgttag        |
| SNP 48 | S6_5276553     | TC      | gcatactaaagtgaaactctctgaca               | gcatactaaagtgaaactctctgac g              |
| SNP 49 | Bra003535_1378 | AG      | aaataaaacataaaacacaggtattcaagaacga       | aaataaaacatacaggtattcaagaacgg            |
| SNP 50 | Bra013533_322  | AG      | acgcctatgacacagagatgta                   | cgcctatgacacagagatgtg                    |
| SNP 51 | Bra018145_216  | TC      | caaatcatgctggaa tagctagtgaact            | agaatcatgctggaa tagctagtgaacc            |
| SNP 52 | Bra022210_779  | AG      | ctcgaattcacaccaggaaga gta                | tcgaattcacaccaggaaga gtg                 |
| SNP 53 | Bra027057_1007 | AT      | caaatcctcgccctcatctgt                    | caaatcctcgccctcatctga                    |
| SNP 54 | Bra035180_1311 | CG      | gcacacattactctctgagaaacac                | agcaccaattactctctgagaaacag               |
| SNP 55 | RsSNP02753     | GT      | cagaaactgctctccacaatcaac                 | cagaaactgctctccacaatcaaa                 |
| SNP 56 | S2_2381385     | AG      | acttgatgagctcttgctgtttt                  | acttgatgagctcttgctgtttt                  |
| SNP 57 | RsSNP13554     | GC      | tgaatagctctttatactctttat ttttctctc       | tgaatagctctttatactctttat ttttctctc       |
| SNP 58 | RsSNP11056     | AG      | caagcatgcttgaaagtgctga                   | aaagcatgcttgaaagtgctg                    |
| SNP 59 | S5_13799765    | GT      | tca gctgcagacaa gga g                    | tcagctgcagacaa gga t                     |
| SNP 60 | S6_7320502     | CT      | gttcttgctgtctca gagacta g                | gttcttgctgtctca gagacta a                |
| SNP 61 | S8_21433770    | TA      | gaagttcaaa gaaa aaggctgattcaga           | aa gttcaaa gaaa aaggctga ttca gt         |
| SNP 62 | S9_12284297    | CT      | gaaactctggatcctgacggta c                 | gaaactctggatcctgacggfat                  |
| SNP 63 | Bra018412_3729 | AG      | catcacctctgca tgaataat tca ca            | catcacctctgcatga taata tca cg            |
| SNP 64 | S9_8224170     | TC      | tggttca ggtgacagtc aat                   | tggttcaggtgacagtc aac                    |
| SNP 65 | Bra027952_1533 | TC      | gcccaagtaagtcacacccctta                  | cccaaagtaagtcacacccctg                   |
| SNP 66 | RsSNP01618     | TC      | tggttta tagttgagtggtttccctaat            | ggttta tagttgagtggtttccctaac             |
| SNP 67 | RsSNP06589     | CG      | cgctccttttcttttctgctgtag                 | cgctccttttcttttctgctga c                 |
| SNP 68 | RsSNP09335     | GA      | aaatatgattaaaggtagaaattacataatcgatgtg    | aaatatgattaaaggtagaaattacataatcgatgta    |
| SNP 69 | RsSNP13590     | GA      | caatcagcttata tgttctgtcttgg              | caatcagcttata tgttctgtcttga              |
| SNP 70 | RsSNP11584     | AG      | caataaaatgta taca ttctgtgatgaaa caca a   | caataaaatgta taca ttctgtgatgaaa cacag    |
| SNP 71 | S5_17417256    | AG      | cgtggatcctgca gataaaca                   | cgtggatcctgca gataaaacg                  |
| SNP 72 | RsSNP15846     | TA      | tatttaa cttaa ttga cagtaga aaa ttcttttga | ta tttaa cttaa attgacagtaga aaa ttctttgt |
| SNP 73 | Bra008631_281  | AG      | ttctgtgagggcggf ggaat                    | ttctgtgagggcggf ggaac                    |
| SNP 74 | Bra014394_526  | TC      | agcggcacaacta taagctga                   | gcggcacaactataagctgg                     |
| SNP 75 | S9_36116104    | GA      | gggtgttctgctgcagcaga g                   | gggtgttctgctgcagcagaa                    |
| SNP 76 | Bra023998_494  | AG      | cgcagctcattatgta cct                     | cgcagctcattatgta ccc                     |
| SNP 77 | RsSNP01249     | CA      | gtcaaaaaggaggacaa tgc                    | gtcaaaaaggaggacaa atga                   |
| SNP 78 | Bra036047_559  | TC      | ga cctgtgacaaatgactccgat                 | acctgtgacaaatgactccgat                   |
| SNP 79 | RsSNP07123     | GA      | ggcaagttcaata ttga acga catg             | tgcaaa gttcaata ttgaacgacata             |
| SNP 80 | RsSNP09967     | AG      | ga gtaa caacttccattggcctaatt             | ga gtaa caa cttcattggcctaatt             |
| SNP 81 | RsSNP14107     | AT      | ga tctctagaagcaca agatcatgta             | atcctctagaagcaca agatcatgtt              |
| SNP 82 | RsSNP14626     | AG      | caaaaagatggttacatgtaccaatca              | caaaaagatggttacatgtaccaatcg              |
| SNP 83 | RsSNP15298     | CT      | ca gctcagtaaaa gatgataa ttaa gtatgctg    | tcagctcagtaaaa gatgataa ttaa gtatgcca    |
| SNP 84 | RsSNP15910     | TA      | tatataa cttatattatggctta caactaaa gggt   | ta tataacta tattatggctta caa ctaa aggta  |
| SNP 85 | S8_8397014     | TC      | tgaatga tctaataa agttaaga ctgcaggat      | gaatga tctaataa agttaaga ctgcaggat       |
| SNP 86 | S9_19198556    | TC      | gggttga aaa gattacaa aatttgcgtct         | gggttga aaa gattacaa aatttgcgtcc         |

(Jatkuu)

## Taulukko 1. Jatkuu

| Koodi  | Merkin nimi    | Alleeli | Forward aluke                    | Reverse aluke                     |
|--------|----------------|---------|----------------------------------|-----------------------------------|
| SNP 87 | Bra019747_1150 | AG      | atcactatfactatctgcaaggcga        | tcactatfactatctgcaaggcag          |
| SNP 88 | RsH016N04      | GA      | cttccgatgcttgaa ccgtc            | acttccgatgcttgaa ccgtt            |
| SNP 89 | Bra028210_473  | TC      | cgggctcattcctctttttaatcatt       | cgggctcattcctctttttaatcatt        |
| SNP 90 | Bra036254_514  | TG      | catagcaaaa ctgattcctctctttta ca  | catagcaaaa ctgattcctctcttttaacc   |
| SNP 91 | RsSNP07307     | TC      | tca ctacataaatctcaa cgtcaccat    | tcactacataaatctcaa cgtcaccac      |
| SNP 92 | S2_2696634     | TC      | tggtagtaaggacacaa ggatgtaa tttt  | tggtagtaaggacacaa ggatgtaa ttic   |
| SNP 93 | RsSNP14170     | CT      | tttcacttgctatcttccaagacaacc      | ctttca cttgctatcttccaagaca ctt    |
| SNP 94 | RsSNP14667     | CA      | gcaagagatcatttgctaactctaaa cc    | gcaagagatcatttgctaactctaaa ca     |
| SNP 95 | RsSNP15376     | GA      | gttcgttgattatcatgaaga atagtagaac | agttcgttgattatcatgaaga atagtagaat |
| SNP 96 | S7_22216759    | AG      | ccagagggtgatcgatctatttcctt       | ccagagggtgatcgatctatttcctc        |

### LIITE 3: RYP SIN SNP-MERKKIEN VALINTA

Taulukko 1. Aiemmin hankkeessa tehty rypsin SNP-merkkien Fluidigm analyysin tulokset.

| Rypsin SNP-merkin nimi | Rypsin kromosomi | Havainnot                             |
|------------------------|------------------|---------------------------------------|
| Bra011803_290 *        | A01              | monistu retikalla, vesipiste kartalla |
| S1_1421658             | A01              | monistu retikalla                     |
| S1_4949500             | A01              | monistu retikalla                     |
| Bra013533_322 *        | A01              |                                       |
| Bra013847_366          | A01              | monistu retikalla                     |
| Bra026330_421 *        | A01              |                                       |
| Bra036921_710 *        | A01              |                                       |
| Bra035434_1643         | A01              | monistu retikalla, vesipiste kartalla |
| Bra021391_2227 *       | A01              |                                       |
| Bra34190 *             | A01              |                                       |
| S1_27862851            | A01              | monistu retikalla                     |
| S2_992964              | A02              | monistu retikalla                     |
| S2_2381385 *           | A02              | vesipiste kartalla                    |
| S2_2696634 *           | A02              |                                       |
| S2_15367590            | A02              | monistu retikalla                     |
| Bra022102_208 *        | A02              |                                       |
| S2_23849214            | A02              |                                       |
| S2_26860448            | A02              | monistu retikalla                     |
| S3_3147962             | A03              | monistu retikalla                     |
| S3_5703963             | A03              | monistu retikalla                     |
| S3_7632153             | A03              | vesipiste kartalla                    |
| Bra000195_592 *        | A03              |                                       |
| S3_11624914            | A03              | monistu retikalla, vesipiste kartalla |
| S3_12993340            | A03              | monistu retikalla                     |
| S3_15273066            | A03              | monistu retikalla                     |
| Bra001295_83           | A03              |                                       |
| Bra001747_921 *        | A03              |                                       |
| S3_19061712            | A03              | monistu retikalla                     |
| S3_22058874 *          | A03              |                                       |
| S3_22380594            | A03              | monistu retikalla                     |
| S3_22964073 *          | A03              |                                       |
| S3_28281130 *          | A03              |                                       |
| Bra023998_494 *        | A03              |                                       |
| Bra014394_526 *        | A04              | vesipiste kartalla                    |

\* käytetty työkalussa

(Jatkuu)

Taulukko 1. Jatkuu

| Rypsin SNP-merkin nimi | Rypsin kromosomi | Havainnot                             |
|------------------------|------------------|---------------------------------------|
| S4_518134 *            | A04              |                                       |
| Bra014504_303          | A04              | monistu retikalla                     |
| Bra032761_3759 *       | A04              |                                       |
| Bra028110_739          | A04              | monistu retikalla                     |
| Bra028210_473 *        | A04              |                                       |
| S4_7043221 *           | A04              |                                       |
| Bra021673_226          | A04              | monistu retikalla                     |
| S5_7510552             | A05              | monistu retikalla                     |
| Bra018412_3729 *       | A05              |                                       |
| Bra018521_468          | A05              | vesipiste kartalla                    |
| S5_12089202            | A05              | vesipiste kartalla                    |
| S5_13799765 *          | A05              |                                       |
| Bra031377_626          | A05              | monistu retikalla                     |
| S5_17417256 *          | A05              |                                       |
| Bra022210_779 *        | A05              |                                       |
| Bra034853_482 *        | A05              | monistu retikalla, vesipiste kartalla |
| Bra039693_983 *        | A06              |                                       |
| S6_4273875             | A06              | monistu retikalla                     |
| S6_4399453 *           | A06              |                                       |
| Bra019747_1150 *       | A06              |                                       |
| S6_5276553 *           | A06              |                                       |
| Bra026058_1631 *       | A06              |                                       |
| S6_7320502*            | A06              | monistu retikalla                     |
| Bra018145_216 *        | A06              |                                       |
| Bra009766_1031*        | A06              |                                       |
| S6_18159649            | A06              | monistu retikalla                     |
| Bra025101_1013 *       | A06              |                                       |
| Bra038819_489 *        | A07              |                                       |
| Bra012200_683*         | A07              | monistu retikalla, vesipiste kartalla |
| Bra003535_1378 *       | A07              | monistu retikalla                     |
| Bra003934_234          | A07              | monistu retikalla                     |
| Bra016250_425 *        | A07              |                                       |
| Bra016154_805          | A07              | monistu retikalla                     |
| S7_22216759*           | A07              | monistu retikalla                     |
| Bra035180_1311 *       | A07              |                                       |

\* käytetty työkalussa

(Jatkuu)

## Taulukko 1. Jatkuu

| Rypsin SNP-merkin nimi | Rypsin kromosomi | Havainnot                             |
|------------------------|------------------|---------------------------------------|
| S8_3194406             | A08              | monistu retikalla                     |
| S8_8397014 *           | A08              |                                       |
| S8_15751223 *          | A08              |                                       |
| Bra010747_186 *        | A08              |                                       |
| S8_21433770 *          | A08              |                                       |
| Bra036254_514 *        | A09              | monistu retikalla                     |
| S9_2081300 *           | A09              |                                       |
| S9_2730453             | A09              |                                       |
| S9_7618398 *           | A09              |                                       |
| Bra027057_1007 *       | A09              |                                       |
| Bra027952_1533 *       | A09              | monistu retikalla, vesipiste kartalla |
| S9_12284297 *          | A09              |                                       |
| S9_17415303            | A09              |                                       |
| S9_19198556**          | A09              |                                       |
| Bra024749              | A09              |                                       |
| Bra036047_559 *        | A09              | monistu retikalla, vesipiste kartalla |
| Bra031154_826 *        | A09              |                                       |
| Bra026898_1237 *       | A09              |                                       |
| S9_36116104 *          | A09              |                                       |
| S9_36713905 *          | A09              |                                       |
| Bra015507_982 *        | A10              | monistu retikalla                     |
| Bra003121_282 *        | A10              |                                       |
| S10_12553750           | A10              |                                       |
| S10_12903912 *         | A10              |                                       |
| Bra008631_281 *        | A10              |                                       |
| S10_14693492           | A10              | monistu retikalla                     |
| Bra009609              | A10              |                                       |

\* käytetty työkalussa



## LIITE 4: KOEJÄSENTEN AJOLEVYKEJÄRJESTYS

Taulukko 1. Tutkimuksen koejäsenten järjestys The Fluidigm 96.96 Dynamic Array™ -ajolevykeessä.

|   | 01              | 02              | 03              | 04              | 05              | 06              | 07              | 08              | 09           | 10           | 11            | 12            |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| A | NTC_1           | Daikon_E1_a     | Daikon_E1_b     | Daikon_E2_b     | Daikon_E2_a     | Daikon_2        | Daikon_3        | Daikon_4        | Daikon_5     | Daikon_6     | BULK-Daikon_1 | BULK-Daikon_2 |
| B | NTC_2           | 4021B_E1_b      | 4021B_E1_a      | 4021B_E2_a      | 4021B_E2_b      | 4021B_2         | 4021B_3         | 4021B_4         | 4021B_5      | 4021B_6      | 4021B_7       | 4021B_8       |
| C | RfA4_1          | RfA4_2          | RfA4_3          | RfA4_4          | RfA4_5          | RfA4_6          | RfA4_7          | RfA4_8          | R2000_1      | R2000_2      | R2000_3       | R2000_4       |
| D | R2000_5         | R2000_6         | R2000_7         | R2000_8         | 4021-2 Rfk_1    | 4021-2 Rfk_2    | 4021-2 Rfk_3    | 4021-2 Rfk_4    | 4021-2 Rfk_5 | 4021-2 Rfk_6 | 4021-2 Rfk_7  | 4021-2 Rfk_8  |
| E | 58.Cordelia 1_1 | 58.Cordelia 1_2 | 58.Cordelia 1_3 | 58.Cordelia 1_4 | 58.Cordelia 1_5 | 58.Cordelia 1_6 | 58.Cordelia 1_7 | 58.Cordelia 1_8 | Cordelia_1   | Cordelia_2   | Cordelia_3    | Cordelia_4    |
| F | Cordelia_5      | Cordelia_6      | Cordelia_7      | Cordelia_8      | Petita_1        | Petita_2        | Petita_3        | Petita_4        | Petita_5     | Petita_6     | Petita_7      | Petita_8      |
| G | BC3F2_1         | BC3F2_2         | BC3F2_3         | BC3F2_4         | BC3F2_5         | BC3F2_6         | BC3F2_7         | BC3F2_8         | BC3F2_9      | BC3F2_10     | BC3F2_11      | BC3F2_12      |
| H | BC3F2_13        | BC3F2_14        | BC3F2_15        | BC3F2_16        | BC3F2_17        | BC3F2_18        | BC3F2_19        | BC3F2_20        | BC3F2_21     | BC3F2_22     | NTC_3         | NTC_4         |

NTC vesikontrolli, E1 DNA-pikaeristys, E2 CTAB